

**Experimentelle Neuro-Onkogenese in der Ratte:  
Identifizierung von risikomodifizierenden Genen**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
Dr. rer. nat.

des Fachbereichs  
Biologie und Geografie  
an der

Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von  
Bettina Winzen

aus Mönchengladbach

Dezember 2007

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2003 bis Dezember 2007 unter der Leitung von PD Dr. med. Andrea Kindler-Röhrborn am Institut für Neuropathologie der Universität Bonn und am Institut für Pathologie und Neuropathologie der Universität Duisburg-Essen angefertigt.

**Gutachter:**

**PD Dr. med. A. Kindler-Röhrborn,**

**Prof. Dr. rer. nat. Helmut Esche,**

**Prof. Dr. rer. nat. Dr. med. Herbert De Groot**

**Tag der mündlichen Prüfung: 30.04.2008**



# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis .....	VII
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Tumoren als komplexe (polygen vererbte) genetische Erkrankungen .....	1
1.2 Stand der Forschung .....	2
1.2.1 Bedeutung prädisponierender Gene und Strategien zur Identifizierung .....	2
1.2.2 Die BD Rattenstämme als Modell für Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der Entstehung von Tumoren des peripheren Nervensystems .....	5
1.2.3 Ergebnisse der Kreuzungsexperimente von BDIV und BDIX Ratten: Identifizierung der Loci <i>Mss1-7</i> und geschlechtsspezifische Effekte .....	6
1.2.4 Analyse der Tumorsuszeptibilität/-resistenz vermittelnden Effektor- mechanismen im peripheren Nervensystem der BD Ratte .....	7
1.3 Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit .....	8
<b>2 Material .....</b>	<b>9</b>
2.1 Versuchstiere .....	9
2.2 Chemikalien .....	9
2.3 Kits, Fertiglösungen und Enzyme .....	12
2.4 Synthetische Oligonukleotide (Primer) .....	12
2.4.1 Primersequenzen der Mikrosatelliten .....	12
2.4.2 Primersequenzen für die Amplifikation des <i>Sry</i> Gens („ <i>Sex determining region of Y-Gen</i> “) zur Bestimmung des Geschlechts .....	12
2.4.3 Primersequenzen für die Sequenzierung der Kandidatengene .....	13
2.4.4 Primersequenzen für die Real-Time-PCR .....	13
2.5 Antikörper .....	13
2.5.1 Primärantikörper .....	13
2.5.2 Detektionssysteme .....	14
2.6 Molekulargewichts-/ Mengenstandards .....	15
2.7 Membranen, Filme, Papier .....	15
2.8 Sonstige Materialien .....	15
2.9 Geräte .....	15

<b>3 Methoden</b>	17
3.1 Kanzerogen-Behandlung	17
3.2 Gewebeentnahme	17
3.3 Genotypisierung	18
3.3.1 Isolierung von DNA aus Rattengewebe	18
3.3.1.1 DNeasy Tissue Kit™	18
3.3.1.2 „Quick and Dirty“-Methode	18
3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	18
3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung	19
3.3.3.1 Prinzip der Genotypisierung (Mikrosatelliten-Analyse mittels PCR)	19
3.3.3.2 Durchführung der PCR	20
3.3.4 Nachweis des Mikrosatelliten-Amplifikats mittels Gelelektrophorese	20
3.3.4.1 Prinzip der Gelelektrophorese (Größenfraktionierung von Nukleinsäuren)	20
3.3.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese einzelsträngiger DNA	21
3.3.4.2.1 Herstellung und Beladung eines Polyacrylamidgels	21
3.3.4.2.2 Denaturierung der Proben	22
3.3.4.2.3 Elektrophorese	22
3.3.4.2.4 Silberfärbung	22
3.4 PCR zur Amplifikation des <i>Sry</i> Gens („ <i>Sex determining region of Y-Gen</i> “)	23
3.5 Auftrennung von DNA in Agarosegelen	24
3.6 Sequenzanalyse	24
3.6.1 Prinzip der Sequenzierung	25
3.6.2 Durchführung der Sequenzierung	25
3.6.2.1 PCR von genomischer DNA	25
3.6.2.2 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)	26
3.6.2.2.1 Gesamt-RNA Isolierung aus Rattengewebe	26
3.6.2.2.2 RT-PCR zur Amplifikation von Kandidatengenfragmenten aus RNA	27
3.6.2.2.3 Reamplifikation von Kandidatengenfragmenten	28

3.6.2.3	Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierreaktion .....	28
3.6.2.4	Aufreinigung des Sequenzierprodukts .....	29
3.6.2.5	Detektion und Auswertung der Sequenzen .....	29
3.7	Expressionsanalyse auf RNA-Ebene .....	29
3.7.1	RNA-Präparation .....	29
3.7.2	cDNA-Synthese .....	30
3.7.3	Quantitative Real-Time-PCR .....	30
3.7.3.1	Prinzip der quantitative Real-Time-PCR .....	30
3.7.3.2	Durchführung der quantitative Real-Time-PCR .....	30
3.7.3.3	Relative Quantifizierung: Vergleichende Ct-Methode .....	31
3.8	Expressionsanalyse auf Proteinebene .....	31
3.8.1	Westernblot .....	31
3.8.1.1	Lyse der Gewebe und Bestimmung der Proteinkonzentration .....	31
3.8.1.2	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	32
3.8.1.2.1	Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Page .....	32
3.8.1.2.2	Durchführung der SDS-Page .....	33
3.8.1.3	Westernblotting .....	34
3.8.1.3.1	Prinzip der Westernblotting-Methode .....	34
3.8.1.3.2	Durchführung der Westernblotting-Methode .....	35
3.8.1.4	Immundetektion .....	35
3.8.1.4.1	Prinzip der Immundetektion .....	35
3.8.1.4.2	Durchführung der Immundetektion .....	35
3.8.2	Histologische Färbungen .....	36
3.8.2.1	Vorbehandlung des Gewebes .....	36
3.8.2.1.1	Fixierung mit Formaldehyd .....	37
3.8.2.1.2	Einbettung in Paraffin und Anfertigung der Paraffinschnitte .....	37
3.8.2.1.3	Anfertigung der Gefrierschnitte .....	37
3.8.2.2	Prinzip der Immunfärbung .....	37

3.8.2.3	Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit der Avidin-Biotin-Methode und 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) an Paraffinschnitten .....	38
3.8.2.4	Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit der Avidin-Biotin-Methode und 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) an Gefrierschnitten .....	40
3.8.2.5	Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung des Er beta Proteins und der Immunzellenmarker .....	40
3.8.3	Markscheidenfärbung mit Luxol Fast Blue .....	41
3.8.3.1	Prinzip der Markscheidenfärbung mit Luxol Fast Blue .....	41
3.8.3.2	Durchführung der Markscheidenfärbung mit Luxol Fast Blue .....	42
3.8.4	Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen .....	42
3.9	Kongene Rattenstämme .....	43
3.9.1	Prinzip.....	43
3.9.2	Züchtung nach der „Speed congenics“ Methode .....	44
4	<b>Ergebnisse</b> .....	46
4.1	Inzidenz und relatives Risiko der Entstehung von MPNSTs bei (BDIX x BDIV) F <sub>2</sub> Ratten in Abhängigkeit von Geschlecht und Genotyp für Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10 ( <i>Mss7</i> ) .....	46
4.2	Keine Interaktion der Loci <i>Mss4</i> und <i>Mss7</i> bei der Vermittlung von Tumoresistenz bei Weibchen .....	49
4.3	Feinkartierung zur weiteren Einengung der Loci <i>Mss4</i> und <i>Mss7</i> .....	50
4.3.1	Suche nach diskriminierenden Mikrosatelliten in den Bereichen zwischen den Markern <i>D6Mgh5</i> bis <i>D6Ngb</i> ( <i>Mss4</i> ) und <i>D10Mgh25</i> bis <i>D10Mgh11</i> ( <i>Mss7</i> ) .....	51
4.3.2	Haplotypenanalyse .....	54
4.4	Verifizierung der <i>Mss</i> Loci und Verkleinerung der physikalischen Abschnitte durch die Züchtung kongener Rattenstämme .....	54
4.4.1	Etablierung der kongenen Rattenstämme BDIX. <i>Mss1</i> (BDIV), BDIX. <i>Mss2</i> (BDIV), BDIX. <i>Mss4</i> (BDIV), BDIX. <i>Mss5</i> (BDIV) und BDIX. <i>Mss7</i> (BDIV) .....	54

4.4.1.1	<i>Mss1</i> .....	58
4.4.1.2	<i>Mss2</i> .....	60
4.4.1.3	<i>Mss5</i> .....	61
4.4.1.4	<i>Mss7</i> .....	61
4.4.1.5	<i>Mss4</i> .....	62
4.4.2	„Whole genome scan“ der kongenen BDIX. <i>Mss4</i> (BDIV) Ratten .....	64
4.4.2.1	Mikrosatelliten für den „Whole genome scan“ .....	65
4.4.2.2	Genotypisierung der Ratten Nr. 206, 219 und 221 .....	65
4.4.3	Induktion von MPNSTs in kongenen BDIX. <i>Mss4a</i> (BDIV) Ratten und Effekte des kongenen Fragments <i>Mss4a</i> auf die Tumorzinzidenz und die Überlebenszeit der Tiere .....	66
4.5	Analyse von Kandidatengen für verschiedene Regionen .....	70
4.5.1	Kandidatengene im Locus <i>Mss2</i> ( <i>Pten</i> ) und Locus <i>Mss4</i> ( <i>Akt1</i> ).....	70
4.5.1.1	Sequenzierung des <i>Akt1</i> und <i>Pten</i> Gens auf genomischer Ebene .....	70
4.5.1.2	Expressionsanalyse des <i>Akt1</i> und <i>Pten</i> Gens auf RNA- und Proteinebene .....	70
4.5.2	Kandidatengene im Locus <i>Mss7</i> .....	73
4.5.3	Kandidatengene im Locus <i>Mss4</i> .....	74
4.5.3.1	Identifizierung von Kandidatengen, die Tumorsuszeptibilität bzw. –resistenz vermitteln nach funktionellen Kriterien ....	74
4.5.3.1.1	„Transforming growth factor beta 3“ ( <i>Tgf beta 3</i> ) Gen und „Latent Tgf beta binding protein 2“ ( <i>Ltbp 2</i> ) Gen .....	74
4.5.3.1.2	Sequenzierung des <i>Tgf beta 3</i> Gens .....	75
4.5.3.1.3	Sequenzierung des <i>Ltbp 2</i> Gens .....	75
4.5.3.2	Identifizierung von Kandidatengen auf der Basis des geschlechtsspezifischen Effekts des Locus <i>Mss4</i> .....	76
4.5.3.2.1	„Estrogen receptor beta“ ( <i>Er beta</i> ) Gen und „Estrogen related receptor beta“ ( <i>Esrrb</i> ) Gen .....	76
4.5.3.2.2	Sequenzierung des „Estrogen related receptor beta“ ( <i>Esrrb</i> ) Gens .....	76

4.5.3.2.3	Sequenzierung des „ <i>Estrogen receptor beta</i> “ ( <i>Er beta</i> ) Gens .....	76
4.5.3.2.4	Promotoraktivität des „ <i>Estrogen receptor beta</i> “ ( <i>Er beta</i> ) Gens im <i>Nervus trigeminus</i> der BD Ratte .....	80
4.5.3.2.5	Expressionsanalyse des <i>Er beta</i> Gens im <i>Nervus trigeminus</i> der BD Ratte auf Proteinebene .....	81
4.5.3.2.6	Expressionsanalyse des <i>Er beta</i> Gens in MPNSTs auf Proteinebene .....	83
4.5.3.2.7	Doppeldetektion des <i>Er beta</i> und der Immunzellantigene im <i>Nervus trigeminus</i> der BD Ratte .....	84
4.6	Myelinfärbung .....	88
5	<b>Diskussion</b> .....	91
6	<b>Zusammenfassung</b> .....	104
7	<b>Ausblick</b> .....	106
8	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	108
9	<b>Anhänge</b> .....	115

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenosin
A. dest.	Aqua destillata
ABComplex	Avidin-Biotin-Komplex
Akt1	Proteinkinase b
APC-Gen	Adenomatous polyposis of the colon gene
APS	Ammonium-Persulfat
AS	Aminosäure(n)
BD Ratten	Berlin Druckrey Ratten
BN	Brown Norway
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Albumin Fraktion V
C	Cytidin
Ca <sup>2+</sup>	Kalziumion
CHAPS	3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylamino]-propansulfate
<i>Cia</i>	<i>Collagen induced arthritis</i>
CNS	Zentrales Nervensystem
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
COX-2	Cyclooxygenase-2
Cy3	Carbocyanin 3
DAB	3'3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DMAB	3,2-Dimethyl-4-aminobiphenyl
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTAF	Dichlorotriazinylamino fluorescein
DTT	Dithioerithritol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykol-bis(aminoethylether)-N,N'-Tetraessigsäure
Er beta	Estrogen receptor beta
Esrrb	Estrogen related receptor beta
EtNU	Ethylnitrosoharnstoff

ERE	Estrogen response element
FAP	familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	Fötales Kälberserum
G	Guanosin
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
h	Stunde(n)
<i>Hcf</i>	<i>Hepatocarcinogenesis in female</i>
<i>Hcs</i>	<i>Hepatocarcinogen sensitivity</i>
HRP	Horseradish Peroxidase
Ile	Isoleucin
Kb	Kilobase(n)
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Ltbp2	Latent Tgf beta binding protein 2
<i>Mcs</i>	<i>Mammary carcinoma susceptibility</i>
<i>Mcsm</i>	<i>Modifier of Mcs</i>
<i>Melm</i>	<i>melanoma modifier</i>
Mg <sup>2+</sup>	Magnesiumionen
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimol
MPNST	Maligner peripherer Nervenscheidentumor
<i>Mss</i>	<i>Mediating schwannoma susceptibility</i>
<i>N. trig.</i>	<i>Nervus trigeminus</i>
na	nicht auswertbar
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaOH	Natriumhydroxid
NP-40	Nonidet P-40
Nts	Neurotensin
OD	Optische Dichte
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PNS	Peripheres Nervensystem
Pten	Phosphatase and tensin homolog
Ptprj	Protein tyrosine phosphatase receptor type j
PVDF	Polyvinylidenfluorid
QTL	Quantitative trait locus



RET	Rearranged during transfection
RNA	Ribonukleinsäure
RNO	Rattenchromosom
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Reverse Transkriptase
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<i>Sc</i>	<i>Susceptibility to colon cancer</i>
SCNT	Somatic cell nuclear transfer
SDS	Natriumlaurylsulfat
SNP	Single nucleotide polymorphismen
<i>Sry-Gen</i>	<i>Sex determining region of Y-Gen</i>
SSLP	Simple sequence length polymorphism
SSR	Simple sequence repeat
STK15	Serine threonine kinase 15
Stk6	Serine threonine kinase 6
STR	Short tandem repeat
T	Thymin
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TBS	Tris Buffered Saline
TBST	Tris Buffered Saline mit Tween®-20
TEMED	Tetramethylethyldiamin
Tgf beta	Transforming growth factor beta
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
V	Volt
W	Watt
w/v	Masse/ Volumen

# 1 Einleitung

## 1.1 Tumoren als komplexe (polygen vererbte) genetische Erkrankungen

Die Entstehung der meisten häufig auftretenden Tumoren ist das Resultat eines Zusammenspiels der individuellen genetischen Konstitution einer Person mit exogenen Faktoren. Tumorauslösende Noxen sind in erster Linie Chemikalien, energiereiche Strahlung und Viren.

Bei den sogenannten Tumor-Suszeptibilitätssyndromen, sehr seltenen monogenen Erkrankungen (wie z. B. dem Li-Fraumeni-Syndrom und der erblichen Form des Retinoblastoms) überwiegt der Einfluss der genetischen Komponente des Tumorrisikos. Diesen Krankheiten liegt eine Keimbahnmutation in einem Tumorsuppressorgen oder - weitaus seltener - in einem Proto-Onkogen zugrunde. Das hohe Tumorrisiko wird in diesen Familien dominant vererbt. Die überwiegende Mehrheit menschlicher Tumorerkrankungen tritt jedoch sporadisch auf, d. h. es zeigen sich keine offensichtlichen familiären Vererbungsmuster.

Die genetische Beteiligung bei sporadisch auftretenden Tumoren konnte in einer umfassenden Studie an zweieiigen und eineiigen Zwillingen belegt werden. Ein genetisch bedingtes Risiko besteht zumindest für Magen-, Lungen-, Brust-, Dickdarm- und Prostatakrebs (Lichtenstein, Holm et al. 2000). Ebenso wurde für bestimmte Tumorentitäten nachgewiesen, dass für nahe Verwandte von Tumorpatienten ein erhöhtes Risiko besteht, den gleichen Tumor auszubilden. Es konnte beispielweise gezeigt werden, dass eine individuelle Erhöhung des Brustkrebsrisikos bei Frauen mit erkrankten Verwandten ersten Grades in Abhängigkeit vom eigenen Alter und dem der Verwandten beim Auftreten des Brustkarzinoms besteht (Claus, Risch et al. 1994).

Man nimmt an, dass das Risiko einen sporadischen Tumor auszubilden durch das abgestimmte Wechselspiel von mehreren Suszeptibilität und Resistenz vermittelnden Allelen mit unterschiedlicher Penetranz vermittelt wird. Tumorerkrankungen erfüllen damit die Kriterien von komplexen polygen bedingten genetischen Erkrankungen (Balmain 2002).

Im Gegensatz zu anderen komplexen genetischen Erkrankungen, wie z. B. Bluthochdruck und primär chronischer Arthritis, beinhaltet die Entwicklung eines Tumors fortwährende genetische Veränderungen in den primär durch exogene Noxen geschädigten Zellen. Dies führt dazu, dass permanent genetische Varianten entstehen, die einer Vielfalt von regulierenden Mechanismen ausweichen können. Es wird angenommen, dass die Entstehung eines

Tumors auf sechs essentielle Veränderungen in der Zellphysiologie zurückzuführen ist, die gemeinsam das maligne Wachstum steuern:

- 1) Unabhängigkeit von Wachstumsfaktoren
- 2) Resistenz gegen zellteilungshemmende Signale
- 3) Umgehung von Apoptose
- 4) Unbegrenzte Teilungsfähigkeit
- 5) Neoangiogenese (Versorgung des Tumors mit Blutgefäßen)
- 6) Invasion in Fremdgewebe und Metastasierung

(Hanahan and Weinberg 2000).

Im Gegensatz zu früheren Annahmen können jedoch auch präneoplastische, für die Tumorentstehung bereits initiierte Zellen durch körpereigene Schutzmechanismen, wie z. B. Apoptose, beseitigt werden (Korkola and Archer 1999). Über die Natur dieser Vorgänge ist bisher wenig bekannt. An dem mehrstufigen Prozess der Tumorentstehung können prinzipiell zwei Kategorien von Genen beteiligt sein. Dies sind zum einen Gene, die im Verlauf der Kanzerogenese strukturelle Veränderungen erfahren, und zum anderen Gene, die die verschiedenen Schritte der Malignisierung modifizieren, selbst aber unverändert bleiben. Es wird angenommen, dass allelische Varianten dieser modifizierenden Gene das individuelle Tumorrisiko determinieren.

## **1.2 Stand der Forschung**

### **1.2.1 Bedeutung prädisponierender Gene und Strategien zur Identifizierung**

Die Identifizierung dieser Gene und ihrer Varianten ist eine unabdingbare Voraussetzung für die Frühdiagnose und Prävention entsprechender Tumorerkrankungen. Dies ist vor allem für die Tumorentitäten wichtig, die eine schlechte therapeutische Beeinflussbarkeit zeigen.

In letzter Zeit sind einige genomweite Assoziationsstudien auf SNP Basis zur Identifizierung von Suszeptibilitätsallelen für die Entstehung häufig auftretender komplexer Erkrankungen, z. B. für das Mamma- bzw. Prostatakarzinom beim Menschen, durchgeführt worden (Easton, Pooley et al. 2007; Gudmundsson, Sulem et al. 2007 Hunter, Kraft et al. 2007; Stacey, Manolescu et al. 2007; Yeager, Orr et al. 2007). Mit Hilfe mehrerer tausend Patienten und Kontrollpersonen, die jeweils mit  $2 - 5 \times 10^5$  SNPs genotypisiert wurden, wurden in schrittweisen Verfahren weitere Suszeptibilitätsloci für Brustkrebs mit interessanten Kandidatengenen, bzw. nicht kodierenden regulatorischen Sequenzen gefunden. Die Identifizierung von Tumorsuszeptibilitätsgenen im Tiermodell auf der Basis positioneller Informa-

tionen bietet sowohl zu diesen finanziell extrem aufwendigen genomweiten Assoziationsanalysen als auch zu kandidatengenbezogenen Studien eine sinnvolle Alternative. Vom weit- aus niedrigeren Aufwand abgesehen besteht hier die Möglichkeit, die gefundenen Suszeptibilitätsloci durch entsprechende Experimente mit kongenen Tierstämmen (s. u.) funktionell zu bestätigen. Darüber hinaus können die biologischen Basismechanismen der Tumoresistenz/-suszeptibilität im gleichen System untersucht werden, so dass man Aufschluss über die Rolle erhält, die das in Frage stehende Gen in diesem Zusammenhang spielt. Bis jetzt zumindest bestanden Zweifel daran, ob die im Tiermodell gewonnenen Resultate auf den Menschen übertragen werden können. In einer kürzlich publizierten Studie zum Brustkrebsrisiko konnte dies jedoch gezeigt werden. In dem menschlichen Ortholog zu einem bei der Ratte gefundenen Tumoresistenzlocus, der in einer nicht kodierenden Region liegt und mindestens zwei nur cis-interagierende regulatorische Elemente enthält, wurden Polymorphismen gefunden, die einen erheblichen Einfluss auf das menschliche Brustkrebsrisiko haben (Samuelson, Hesselton et al. 2007).

Es gibt ingezüchtete Nagertierstämme, die ein breites Spektrum an Reaktionen gegenüber der Entstehung spontan oder durch Kanzerogene induzierter Tumoren zeigen, das von kompletter Resistenz bis zu hoher Suszeptibilität reicht (Balmain and Nagase 1998). Unter Verwendung segregierender Kreuzungen zwischen suszeptiblen und resistenten Tierstämmen können Genloci, die das Tumorrisiko modifizieren, auch wenn diese nur geringe Effekte ausüben, empirisch kartiert werden.

In den vergangenen zehn Jahren sind in Maustumormodellen mehr als 100 verschiedene Tumorsuszeptibilitätsloci kartiert worden. Die ersten Genorte, die allelspezifische Effekte im Hinblick auf das Tumorrisiko vermittelten, bezogen sich auf Tumoren der Leber (Gariboldi, Manenti et al. 1993a), der Lunge (pulmonale Adenome) (Gariboldi, Manenti et al. 1993b) und auf das Plasmozytom (Mock, Krall et al. 1993). Der *Mom1* Locus wurde als erster Genort, mit einer modifizierenden Wirkung auf eine Keimbahnmutation eines Tumorsuppressorgens (*Apc*) kartiert. Der polygene Charakter des Erbgangs für Tumorsuszeptibilität und Resistenz in der Maus wurde erstmals am Beispiel des hepatozellulären Karzinoms gezeigt (Dragani, Manenti et al. 1995).

Bisher sind in Mausmodellen mit polygenem Erbgang fünf Kandidatengene identifiziert worden, die nachweislich im Zusammenhang mit der Tumorsuszeptibilität stehen (Cormier, Bilger et al. 2000; Ruivenkamp, van Wezel et al. 2002; Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003; Youngren, Coveney et al. 2005; Liu, Wang et al. 2006). Darunter ist das *Ptprj* Gen, für den mit Hilfe von rekombinanten ingezüchteten (kongenen) Stämmen kartierten Colontumor-

Suszeptibilitätslocus *Scc1* (Ruivenkamp, van Wezel et al. 2002) und *Stk6/STK15* als Suszeptibilitätsgen für die Hauttumorigenese (Ewart-Toland, Briassouli et al. 2003).

*Ptprj* scheint auch bei der Entstehung menschlicher Tumoren eine wichtige Rolle zu spielen. Das menschliche Homolog zeigt eine Reihe von Polymorphismen. Es scheint mit dem in der centromeren Region von Chromosom 11 gelegenen Tumorsuppressorgen identisch zu sein, dessen hemizygoter Verlust colorektalen Adenokarzinomzellen einen selektiven Wachstumsvorteil verschafft.

Für das menschliche Homolog des *Stk6* Gens der Maus *STK15* wurde ein häufig vorkommendes variantes Allel mit einem Aminosäureaustausch (31 Phe→Ile) identifiziert, das in Tumoren heterozygoter Patienten preferentiell amplifiziert ist und mit dem Grad der Aneuploidie in menschlichen Colonkarzinomen assoziiert ist. Das humane *STK15* Gen ist bei der Chromosomensegregation während der Mitose, die einen kritischen Prozess bei allen Tumortypen darstellt, beteiligt. Daher wurde die Assoziation der humanen *Ile31* Variante des *STK15* Gens mit dem Krebsrisiko gegenüber der Entstehung von verschiedenen Tumoren, wie Colon-, Brust-, Prostata-, Lungentumoren, in einer Meta-Analyse untersucht. Hierzu wurden die Daten von 15 Studien verwendet. Die Meta-Analyse zeigte, dass die humane *STK15 Ile31* Variante als Suszeptibilitätsgen mit niedriger Penetranz für verschiedene Tumortypen fungiert (Ewart-Toland, Dai et al. 2005).

Während die Maus auch noch heute überwiegend für die genetische Analyse monogener Erkrankungen eingesetzt wird, wird für die meisten komplexen genetischen Erkrankungen die Ratte als Modellorganismus bevorzugt, vor allem deshalb, weil die Physiologie vieler Krankheitsbilder, wie z. B. Bluthochdruck, über Jahrzehnte in dieser von den Größenverhältnissen günstigeren Spezies analysiert worden ist und eine Fülle von physiologischen und pharmakologischen Daten existiert. Im gleichen Zusammenhang ist durch gezielte Zucht eine Reihe von Inzuchtstämmen entstanden, die für das Auftreten verschiedener komplexer genetischer Erkrankungen hochempfindlich bzw. resistent sind.

Auch für Untersuchungen zur Prädisposition gegenüber der Entstehung bestimmter Tumoren, wie z. B. dem Mammakarzinom (Shepel, Lan et al. 1998) sowie Lebertumoren (De Miglio, Pascale et al. 2002) bzw. Tumoren des zentralen und peripheren Nervensystems (Kindler-Rohrborn, Kolsch et al. 1999), wird die Ratte als Modellorganismus bevorzugt. Im Falle von Mammatumoren wird die Ratte vor allem deswegen eingesetzt, weil bei der Maus die meisten Tumoren viral induziert sind; bei Tumoren des Nervensystems, von den Größenverhältnissen abgesehen, vor allem, weil außer Mausstämmen, in denen bestimmte Tumorsuppressorgene wie *Tp53* oder *Nf1* durch die Knockout-Technik ausgeschaltet wurden

(Cichowski, Shih et al. 1999; Reilly, Loisel et al. 2000), keine adäquaten Mausmodelle zur Verfügung stehen. Diese Knockout-Tiere sind eher Modellorganismen für dominant vererbare Tumorsuszeptibilitätssyndrome und eignen sich weniger für die Analyse des polygenbedingten Prozesses der Tumorentstehung beim Menschen.

Für die Ratte als Modellorganismus steht mittlerweile im Vergleich zur Maus ein ähnliches Spektrum an Ressourcen für die Genomforschung zur Verfügung. Inzwischen wurde die vollständige Nukleotidsequenz (Gibbs, Weinstock et al. 2004) und eine SNP (Single nucleotide polymorphism) Karte des Rattengenoms veröffentlicht (Zimdahl, Nyakatura et al. 2004). Die Herstellung transgener Ratten ist seit langem ein Routineverfahren (Mullins, Peters et al. 1990). Bisher konnte man jedoch noch keine embryonalen Stammzellen der Ratte isolieren, die für die homologe Rekombination und zur Herstellung von Knockout-Ratten eingesetzt werden könnten. Es existieren aber alternative Strategien für die Herstellung von Keimbahnmutanten, wie die SCNT-Technik (Somatic cell nuclear transfer) (Zhou, Renard et al. 2003) und die EtNU (Ethylnitrosoharnstoff) induzierte Keimbahnmutagenese (Zan, Haag et al. 2003). Beide Verfahren erfordern zwar im Vergleich zur Stammzell-Technologie einen erheblich höheren Aufwand, können jedoch zur Erzeugung von Knockout-Ratten prinzipiell verwendet werden.

Bisher ist es gelungen, auf der Basis von QTLs mit Hilfe kongener Tierstämme und der bereits erwähnten genomischen Ressourcen Kandidatengene für Insulin-Resistenz Syndrome (Aitman, Glazier et al. 1999), Diabetes mellitus (Yokoi, Komeda et al. 2002; Blankenhorn, Descipio et al. 2007) und rheumatoide Arthritis (Olofsson, Holmberg et al. 2003) und Bluthochdruck (Graham, McBride et al. 2007) zu identifizieren. Durch Analysen der Basensequenz und Expression sowie durch weitere funktionelle Analysen konnte die Beteiligung dieser Gene bei den entsprechenden Suszeptibilitätsphänomenen nachgewiesen werden.

### **1.2.2 Die BD Rattenstämme als Modell für Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der Entstehung von Tumoren des peripheren Nervensystems**

Ein geeignetes Tiermodellsystem zur Identifizierung von Suszeptibilitäts-/ Resistenzgenen für die Neuro-Onkogenese bietet die durch EtNU-induzierte Tumorentstehung im Nervensystem von Ratten der BD Stämme. In diesem Modell wird die Initiation der Kanzerogenese durch eine einmalige Dosis der DNA-reaktiven, mutagenen und kanzerogenen N-Nitroso-Verbindung Ethylnitrosoharnstoff (EtNU) bewirkt. Dieses alkylierende Kanzerogen hat unter *in vivo* Bedingungen eine sehr kurze Halbwertszeit von ca. acht Minuten. Beim heterolytischen Zerfall von EtNU in wässriger Lösung entsteht ein hochreaktives Ethyldiazonium-

Ion-Intermediat, das mit der zellulären DNA reagiert. Es erfordert also keine enzymatische Aktivierung und wirkt in allen Zellen des Körpers gleich (Laerum, Rajewsky et al. 1977). Die mutagene Wirkung von EtNU beruht auf der chemischen Eigenschaft, seine Ethylgruppe irreversibel auf Sauerstoff- und Stickstoffatome der DNA-Basen übertragen zu können. Während der Replikation der DNA kann dies zu Fehlpaarungen im komplementären Strang führen. EtNU verursacht hauptsächlich Punktmutationen, selten Mutationen an GC-Basenpaaren, meistens in Form eines Austauschs von A-T→T-A-Basenpaaren.

Trotzdem führt eine einmalige EtNU-Gabe bei BDIX Ratten in der späten Prä- und frühen Postnatalperiode fast ausschließlich zu malignen Tumoren des peripheren (PNS) und zentralen Nervensystems (ZNS); ca. 90% aller entstandenen Tumoren (Ivankovic, Druckrey et al. 1966; Laerum, Rajewsky et al. 1977; Laerum, Rajewsky et al. 1982). Der Grad der neuroonkogenen Wirkung ist dabei stark abhängig vom Entwicklungs- bzw. Differenzierungszustand des Nervensystems zum Zeitpunkt des EtNU-Pulses. Eine maximale Ausbeute an malignen peripheren Nervenscheidentumoren (MPNSTs) der *Nervi trigemini* beobachtet man nach EtNU-Exposition am Postnataltag 1 (über 85%) bei Ratten des BDIX Stamms (Druckrey, Schagen et al. 1970). Im Hinblick auf die Inzidenz von Tumoren des Nervensystems sowie deren Latenzzeit, spielt der genetische Hintergrund der verwendeten Tierstämme eine kritische Rolle: Die Ratten des BDIV Stammes sind fast vollständig resistent gegenüber der Entwicklung von Tumoren des peripheren Nervensystems.

Dieses Tiermodell bietet daher günstige Voraussetzungen zur Analyse der molekularen und zellulären Mechanismen von Tumorsuszeptibilität und –resistenz.

### **1.2.3 Ergebnisse der Kreuzungsexperimente von BDIV und BDIX Ratten: Identifizierung der Loci *Mss 1-7* und geschlechtsspezifische Effekte**

Durch EtNU-Behandlung von BDIV und BDIX Hybriden beider Orientierungen konnte gezeigt werden, dass der Resistenz bzw. Suszeptibilität gegenüber der PNS-Kanzerogenese ein polygener Erbgang zugrunde liegen muss, bei dem ein Imprinting der beteiligten Gene oder mitochondriale Vererbung ausgeschlossen werden kann. Mit Hilfe eines „Whole genome scan“ an (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Ratten und einer (BDIX x BDIV) x BDIX Rückkreuzungsgeneration konnten sieben Loci (*Mss1-7*) kartiert werden, die die Tumorzinzidenz und die Überlebenszeit in allelspezifischer Weise modifizieren (Koelsch, Fischer et al. 2005). Während bei den Loci *Mss1* (Chromosom 10), *Mss2* (Chromosom 1), *Mss4* (Chromosom 6), *Mss6* (Chromosom 15) und *Mss7* (Chromosom 10) die Suszeptibilität vermittelnden Allele

von der BDIX Ratte stammen, vermitteln bei den Loci *Mss3* (Chromosom 3) und *Mss5* (Chromosom 13) BDIV Allele die Prädisposition zur Tumorentstehung.

Die meisten dieser Loci üben geschlechtsspezifische Effekte aus. Die Stärke dieser Effekte variiert je nach Locus und reicht von geringem Einfluss auf die Tumorentstehung bis hin zur nahezu vollständigen Resistenz. F<sub>2</sub> Weibchen, die für die Loci *Mss4* und *Mss7* homozygote BDIV Allele aufweisen, sind gegenüber der PNS-Kanzerogenese fast vollständig resistent. Da in der (BDIX x BDIV) F<sub>1</sub> x BDIX Rückkreuzungsgeneration diese geschlechtsspezifischen Effekte der Loci *Mss4* und *Mss7* nicht beobachtet werden können, liegt die Vermutung nahe, dass der Resistenz vermittelnde Effekt von homozygoten BDIV Allelen, die in der Rückkreuzung dieser Orientierung nicht vorkommen, ausgeht.

#### **1.2.4 Analyse der Tumorsuszeptibilität/-resistenz vermittelnden Effektormechanismen im peripheren Nervensystem der BD Ratte**

Im Hinblick auf die Effektormechanismen der Tumoresistenz im peripheren Nervensystem der BDIV Ratte konnte gezeigt werden, dass an diesem Phänomen eine Erkennung und Elimination prämaligener, im *Neu/ErbB-2* Gen mutierter Schwann Zellen beteiligt ist. Diese Zellen sind bereits wenige Tage nach EtNU-Behandlung nachweisbar und stellen eine Hochrisikopopulation für weitere Schritte der malignen Transformation dar. In beiden Rattenstämmen proliferieren diese Zellen stark, bis ca. zwischen Tag 80 und 90 nach EtNU-Behandlung. In den *Nervi trigemini* der BDIV Ratte wird dann diese Zellpopulation immer kleiner und verschwindet im weiteren Verlauf vollständig. Im Gegensatz dazu proliferieren die prämaligen Zellen im PNS der BDIX Ratte weiter und durchlaufen weitere genetische Veränderungen, bis vollständig maligne Tumoren entstehen, die nach ca. sechs Monaten zum Tod der Tiere führen (Kindler-Rohrborn, Kind et al. 2000). Es ist wahrscheinlich, dass die prämaligen Zellen durch die Einleitung der Apoptose eliminiert werden, die entweder durch gewebe-intrinsische Mechanismen oder durch Zellen des Immunsystems eingeleitet werden könnte. In den *Nervi trigemini* beider Rattenstämmen kommt es als Folge der EtNU-Behandlung zu einer massiven Einwanderung von CD18 exprimierenden Leukozyten, bei denen es sich um CD8 positive zytotoxische T Zellen, CD4 exprimierende T Helferzellen und Makrophagen sowie ED1 positive und ED2 positive Makrophagen handelt (Gering, Marx et al. 2006). Diese zelluläre Immunantwort ist jedoch nicht rattenstammspezifisch, sondern wird in ähnlichem Ausmaß sowohl bei Ratten des tumorresistenten BDIV Stamms als auch bei tumorsensitiven BDIX Tieren beobachtet. Beobachtungen an thymektomierten Ratten zeigen, dass T Lymphozyten bei der Tumörprävention eine wichtige Rolle zu spielen scheinen, da die Inzidenz von MPNSTs bei der BDIV Ratte um einen Faktor von ca. 30- 50 gesteigert werden



konnte (Marx, Röhrborn et al. 2007 zur Veröffentlichung eingereicht). Diese Befunde deuten darauf hin, dass Tumorsuszeptibilität und Resistenz durch funktionelle Unterschiede zwischen den Effektorzellen des Immunsystems bedingt sein könnten.

Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass *Neu/ErbB-2* mutante prämaligne Schwann Zellen in den *Nervi trigemini* von BDIX Ratten den Zellen des Immunsystems entkommen oder den Prozess ihrer Eliminierung inhibieren können, während prämaligne BDIV Schwann Zellen dazu nicht in der Lage sind.

### **1.3 Zielsetzung der vorliegenden Doktorarbeit**

Übergeordnetes Ziel meines Promotionsvorhabens war die Identifizierung von Genen, die die individuelle (Inzuchtstamm-spezifische) Prädisposition bzw. Resistenz gegenüber der Entstehung chemisch induzierter Tumoren des Nervensystems bei der Ratte vermitteln. Die Identifizierung dieser Gene soll nicht nur ein grundlegendes Verständnis der Vorgänge vermitteln, die zur Initiation und Progression neuraler Tumoren führen, sondern auch Ansatzpunkte für eine wirkungsvolle Prävention und/ oder therapeutische Intervention bieten. Dies sollte auf der Basis der bekannten Loci *Mss1-7* geschehen, die durch Assoziationsanalysen lokalisiert wurden. Der Schwerpunkt lag dabei auf den Loci *Mss4* und *Mss7*, für die starke geschlechtsspezifische Haupteffekte auf Tumorinzidenz und Latenzzeit gezeigt werden konnten und für die sich eine weitere Einengung durch Haplotypenanalyse anbot. Das Promotionsprojekt beinhaltete die Auswahl von Kandidatengenen in den eingengten Loci nach positionellen und funktionellen Kriterien, d. h. Gene, die in den Loci *Mss4* und *Mss7* liegen und deren Funktion in Zusammenhang mit den bisher bekannten Effektormechanismen für Suszeptibilität und Resistenz steht, kommen als Kandidaten in Frage. Die ausgewählten Kandidatengene sollten durch vergleichende Sequenz- bzw. Expressionsanalysen in beiden Rattenstämmen überprüft werden.

Weiterhin sollte die Zucht kongener Rattenstämme, die Resistenz vermittelnde Fragmente (BDIV) auf dem genetischen Hintergrund der suszeptiblen Ratte (BDIX) tragen, für die Loci *Mss1*, 2, 4, 6 und 7 weitergeführt werden. Die Effekte, die der Locus *Mss4* hinsichtlich Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese im PNS ausübt, sollten über die Ermittlung der Tumorinzidenz und der Überlebenszeit kongener BDIX.*Mss4*(BDIV) Ratten nach EtNU-Exposition geprüft werden.

Mit Hilfe dieser kongenen Rattenstämme sollte es möglich werden, die Genorte zu verifizieren und sie durch weitere Rückkreuzungen einzuengen und dadurch die Wahl der Kandidatengene stark einzuschränken.

## 2 Material

### 2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden ingezüchtete BD (Berlin Druckrey) Ratten der Stämme IV und IX verwendet (Druckrey 1971).

Die Züchtung, Haltung und Pflege der Ratten erfolgte in der Versuchstieranlage des Instituts für Zellbiologie (Tumorforschung), Universitätsklinikum Duisburg-Essen. Die Tiere wurden unter Standardbedingungen gehalten und von geprüften Versuchstierpflegern betreut. Sie erhielten Wasser und „Altromin Zucht- und Haltungsfutter“ ad libitum.

In Übereinstimmung mit § 8 des Tierschutzgesetzes wurden die anzeige- bzw. genehmigungspflichtigen Tierversuche bei der zuständigen Behörde, der Bezirksregierung Düsseldorf, beantragt und genehmigt.

### 2.2 Chemikalien

Tabelle 2.1: Verwendete Chemikalien mit Firmenstandort und Bestellnummer.

Chemikalie	Firma, Standort	Bestellnummer
Aceton	Merck, Darmstadt	1.00014.2511
Acrylamide-Bis-Lösung (29:1) 30% (w/v)	Serva, Heidelberg	10687.01
Acrylamide-Bis-Lösung (19:1) 40% (w/v)	Serva, Heidelberg	10679.02
Agarose	Roth, Karlsruhe	2267.4
Albumin Fraktion V (BSA)	Sigma-Aldrich, Steinheim	A-4503
Ammoniak (25%)	Merck, Darmstadt	105422
Ammonium-Persulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim	A3678
Ampuwa®	Fresenius, Bad Homburg	40676.00.00
Benzamidin	MP Biomedicals, Eschewege	195068
Borsäure	Roth, Karlsruhe	5935.2
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim	B-8026
3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylalmino]-propansulfate (CHAPS)	MP Biomedicals,	1-800-854-0530

	Eschewege	
Citratmonohydrat	Merck, Darmstadt	K1404144
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Sigma, Steinheim	D-8417
3,3-Diaminobenzidin-Tetra-hydrochlorid (Sigma FAST™DAB)	Sigma, Steinheim	D-4168
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt	6580.0500
Dithioerithritol (DTT)	Sigma, Steinheim	D9779
Eosin	Sigma, Steinheim	E4382
Ethidiumbromid	Serva, Heidelberg	21251
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim	E-5134
Ethylenglykol-bis(aminoethylether) -N,N'-Tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim	E-4378
Ethylnitrosoharnstoff (EtNU)	Sigma-Aldrich, Steinheim	N3385
Essigsäure (96%)	KMF Laborchemie, Lohmar	KMF.08-206
Ethanol (100%)	Merck, Darmstadt	1.00983.2511
Fötales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein	10270-106
Formaldehydlösung (37%)	Merck, Darmstadt	1.03999.1000
Formamid	Sigma-Aldrich, Steinheim	221198
Glycerin	Sigma-Aldrich, Steinheim	G-5516
Glycin	Roth, Karlsruhe	3908.2
Hämotoxylin nach Böhmer	Chroma, Münster	2C 160
Hämalaun nach Mayer	Merck, Darmstadt	1.09249.0500
Leupeptin	Sigma-Aldrich, Steinheim	L2884
Lithiumcarbonat	Merck, Darmstadt	105671
Luxol fast blue	Serva, Heidelberg	28106
Kaliumdihydrogenphosphat	KMF Laborchemie, Lohmar	KMF.08-407

2-Mercaptoethanol	Serva, Heidelberg	28625
Methanol	Merck, Darmstadt	1.06009.2511
Magermilchpulver (Non-fat dry milk)	Bio Rad, München	170 6404
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt	2464769
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt	1.06392.500
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe	3957.3
Natriumhydroxid	Roth, Karlsruhe	6771.1
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim	S7920
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe	2326.1
Natriumvanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim	590088
Nonidet P-40 (NP 40)	Sigma-Aldrich, Steinheim	N-6507
PBS Trockensubstanz ohne $\text{Ca}^{2+}\text{Mg}^{2+}$	Biochrom AG, Berlin	L 182-10
Salzsäure (25%)	Merck, Darmstadt	1.00316.2511
Salpetersäure (65%)	Merck, Darmstadt	1.00456.2500
Silbernitrat	Roth, Karlsruhe	7908.2
Sucrose	Merck, Darmstadt	1.07687.1000
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Bio Rad, München	161.0801
Trizma®Base	Sigma-Aldrich, Steinheim	T-1503
Trizma®Hydrochloride	Sigma-Aldrich, Steinheim	T-3253
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim	X-100
Tween®-20	Sigma-Aldrich, Steinheim	P-9416
Harnstoff (Urea)	MP Biomedicals, Eschewege	191450
Xylencyanol	Sigma-Aldrich, Steinheim	X-4126
Xylol	KMF Laborchemie, Lohmar	KMF.30-060.9025

## 2.3 Kits, Fertiglösungen und Enzyme

- DNeasy Blood and Tissue Kit™ von Qiagen, Hilden (Bestellnr. 69506)
- QIAquick PCR Purification Kit™ von Qiagen, Hilden (Bestellnr. 28104)
- QIAquick Gel Extraction Kit™ von Qiagen, Hilden (Bestellnr. 28706)
- ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit von Applied Biosystems, Weiterstadt (Bestellnr. 4336774)
- DyeEx 2.0 Spin Kit™ von Qiagen, Hilden (Bestellnr. 63206)
- Taq DNA Polymerase von New England BioLabs, Frankfurt (Bestellnr. M0267L)
- Desoxynucleotide Solution Set von New England BioLabs, Frankfurt (Bestellnr. N0446S)
- Amersham™ ECL Western Blotting Analysis System von GE Healthcare, Braunschweig (Bestellnr. RPN2108)
- RNeasy® Mini Kit von Qiagen, Hilden (Bestellnr. 74104)
- One Step RT- PCR Kit™ von Qiagen, Hilden (Bestellnr. 210212)
- SuperScript™ III First-Strand Synthesis System for RT-PCR von Invitrogen, Karlsruhe (Bestellnr. 18080-051)
- „Complete-Protease-Inhibitoren-Cocktail“-Tabletten von Roche, Mannheim (Verdünnung nach Angaben des Herstellers) (Bestellnr. 04719956001)
- DC-Protein-Assay von Bio-Rad, München (Bestellnr. 500-0116)
- Sybr Green Mastermix von Applied Biosystems, Weiterstadt (Bestellnr. 4309155)

## 2.4 Synthetische Oligonukleotide (Primer)

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen, Karlsruhe bezogen. Die Primer wurden auf 100 µM verdünnt. Aus dieser Vorverdünnung wurden 40 µl entnommen und mit 360 µl ddH<sub>2</sub>O (Ampuwa®) auf die Endkonzentration von 10 µM gebracht.

### 2.4.1 Primersequenzen der Mikrosatelliten

Die Mikrosatelliten-DNA wurde mittels PCR amplifiziert. Die Primersequenzen der verwendeten Mikrosatellitenmarker (siehe Anhang 2) wurden größtenteils der öffentlichen Datenbank „Rat Genome Database“ (<http://rgd.mcw.edu/objectSearch/sslQuery.jsp>) entnommen.

### 2.4.2 Primersequenzen für die Amplifikation des *Sry* Gens („*Sex determining region of Y-Gen*“) zur Bestimmung des Geschlechts

Sequenz (5' → 3')	
CGGAGAGAGGCACAAGTTGGCTC	SRY-F
TTTGTTGAGGCAACTTCACGCTGC	SRY-R

### 2.4.3 Primersequenzen für die Sequenzierung der Kandidatengene

- *Akt1* (auch als *Proteinkinase b (Pkb)* bezeichnet),
- *Pten* (*Phosphatase and tensin homolog*),
- *Tgf beta 3* (*Transforming growth factor beta 3*),
- *Ltbp 2* (*Latent transforming growth factor beta binding protein 2*),
- *Er beta* (*Estrogen receptor beta*) und
- *Esrrb* (*Estrogen related receptor beta*).

(siehe Anhang 3)

### 2.4.4 Primersequenzen für die Real-Time-PCR

Sequenz (5' →3')	
AGATCATGCAGCACCGCTTC	Q-AKT1-F2
GGTGACCTGGGGCTTGAAAG	Q-AKT1-R2
ATTCCAATGTTCA GTGGCGGAAC	Q-PTEN-F1
GGGTCCTGAGTTGGAGGAGTAG	Q-PTEN-R1
TGCCAAGTATGATGACATCAAGAAG	Q-GAPDH-F
TAGCCCAGGATGCCCTTTAGT	Q-GAPDH-R

## 2.5 Antikörper

### 2.5.1 Primärantikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 2.2: Verwendete Primärantikörper.

Antikörperbezeichnung	Spezifität	Quelle/Referenz (Bestellnr.)
Akt1 (2H10) Monoclonal Antibody	spezifisch für Akt1, unabhängig von Phosphorylierung	New England BioLabs, Frankfurt am Main (2967)
Pten (26H9) Monoclonal Antibody	C-terminale Sequenz des humanen PTEN	New England BioLabs, Frankfurt am Main (9556)
Chicken Polyclonal ER beta 503 IgY	“Estrogen receptor beta” 503 Protein (beschrieben bei(Ogawa, Inoue et al. 1998)	J.-A. Gustafsson, Karolinska Institut, Stockholm, Schweden
Polyclonal Antibody to Estrogen Receptor Beta	AS 55-70 des Ratten “Estrogen receptor beta”	Acris, Hiddenhausen (SP5198P)

Monoclonal Anti- $\beta$ -Actin Clone AC-74	N-terminales Ende der $\beta$ -Isoform von Aktin	Sigma-Aldrich, Steinheim (A2228)
Mouse Anti Rat CD4 Clone W3/25	Ratten CD4 (T-Helfer- Zellen und Makrophagen)	Serotec, Düsseldorf (MCA55R)
Mouse Anti Rat CD8 alpha Clone MRC OX-8	Ratten CD8 (zytotoxische T- und meisten NK- Zellen)	Serotec, Düsseldorf (MCA48R)
Mouse Anti Rat CD68 Clone ED1	Ratten ED1 (Pan Makrophagen-Marker)	Serotec, Düsseldorf (MCA341R)
Mouse Anti Rat CD163 Clone ED2	Ratten ED2 (residente Makrophagen)	Serotec Düsseldorf (MCA342R)
Mouse Anti Rat TCR alpha/ beta Clone R73	Ratten T-Zell-Rezeptor (T-Zellen)	Serotec, Düsseldorf (MCA453G)

## 2.5.2 Detektionssysteme

Die in dieser Arbeit verwendeten Detektionssysteme sind in den folgenden Tabellen zusammengefasst. Die Angaben entsprechen denen des Herstellers.

Tabelle 2.3: Verwendete Detektionssysteme.

Aus Spezies/ Substanz	Spezifität	Konjugation	Adsorption gegen Serumproteine	Hersteller, Bestellnr.
Esel IgG, F(ab') 2-Fragment	Anti-Huhn IgG (H+L)	Biotin	Bo, Go, Gp, Hs, Ho, Hu, Ms, Rb, Rt, Sh	Dianova, Hamburg 703-066-155
Ratten IgG, F(ab') 2-Fragment	Anti-Maus IgG (H+L)	Biotin	Bo, Ho, Hu, Rb, Rt	Dianova, Hamburg 415-066-166
Esel IgG, F(ab') 2-Fragment	Anti-Maus IgG (H+L)	Cy3	Bo, Ck, Go, Gp, Hs, Ho, Hu, Ms, Rb, Rt, Sh	Dianova, Hamburg 715-166-151
Streptavidin		DTAF		Dianova, Hamburg 016-010-084
ABComplex/HRP		Biotinylierte HRP		DAKO, Hamburg K035511-2
Sekundärantikörper (Amersham <sup>TM</sup> ECL Western Blotting)	Anti-Maus	Peroxidase		GE Healthcare, Braunschweig RPN2108
Sekundärantikörper (Amersham <sup>TM</sup> ECL Western Blotting)	Anti- Kanninchen	Peroxidase		GE Healthcare, Braunschweig RPN2108

## 2.6 Molekulargewichts-/ Mengenstandards

- DNA-Mengenstandard:  
MassRuler™ DNA Ladder (low range)  
von Fermentas, St. Leon-Rot (Bestellnr. SM0383)
- DNA-Längenstandard:  
GeneRuler 100bp Ladder  
von Fermentas, St. Leon-Rot (Bestellnr. SM1143)
- Proteingewichtsmarker für SDS-PAGE:  
SeeBlue® Plus2 (Pre-Stained Standard)  
von Invitrogen, Karlsruhe (Bestellnr. LC5925)

## 2.7 Membranen, Filme, Papier

- Immobilon™-P Transfer Membranes (PVDF Membran)  
von Sigma-Aldrich, Steinheim (Bestellnr. P-2563)
- Amersham Hyperfilm™ ECL  
von GE Healthcare, Braunschweig (Bestellnr. RPN3103K)
- Whatman Papier  
von Schleicher & Schuell, Dassel (Bestellnr. 3003-911)
- Objektträger SuperFrost®Plus  
von Menzel, Braunschweig (Bestellnr. J1800AMNZ)

## 2.8 Sonstige Materialien

- Tissue-Tek®  
von Sakura Finetek, Heppenheim (Bestellnr. 4583)
- Fluoromount G  
von Biozol, München (Bestellnr. 0100-01)
- Mineralöl für PCR  
von Sigma-Aldrich, Steinheim (Bestellnr. M5904)
- Sigmacote®  
von Sigma-Aldrich, Steinheim (Bestellnr. SL2)
- Dako Pen for Immunocytochemistry  
von Dako, Hamburg (Bestellnr. S2002)
- Rattenserum  
von Dianova, Hamburg (Bestellnr. 012-000-001)
- Eselserum  
von Dianova, Hamburg (Bestellnr. 017-000-001)

## 2.9 Geräte

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte.

Gerät	Typ	Firma
Blotkammer	Fast Blot, Typ B34	Biometra, Göttingen
Elektrophoresekammer	Typ G45/1	Biometra, Göttingen



Einbettautomat	Tissue-Tek® VIP 2000 Modell 4622	Miles Scientific, Naperville, IL, USA
Fluoreszenzmikroskop	Axio Imager.Z1	Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Göttingen
Gefriermikrotom	Typ HM 560	Microm, Walldorf
Geltrockner	Model SE1160	Hoefer Pharmacia Biotech, Freiburg
Heiz/Magnet-Rührer	Typ IKA-Combimag RHC	Janke & Kunkel, Staufen
Homogenisator	Polytron PT 2100	Kinematica, Littau-Luzern
Kamera	Gel Doc 1000	Bio Rad, München
pH-Meter	CG 840	Schott, Mainz
Power Supply (Netzgerät)	Power-All 3000V/200mA	Serva, Heidelberg
Power Supply (Netzgerät)	Electrophoresis Power Supply	Renner, Darmstadt
Real-Time-Cycler	ABI PRISM® 7700 SDS	Applied Biosystems, Weiterstadt
Rotationsmikrotom	Typ HM 355 S	Microm, Walldorf
Schüttler	Kombischüttler KL 2	Edmund Bühler, Tübingen
Sequenzierautomat	373A DNA Sequencer	Applied Biosystems, Weiterstadt
Sequenziergelkammer	Model S2  - Gießrahmen - Spacer - Haifischzahnkamm	Life Technologies, Gibco BRL, Eggenstein Life Technologies Labtech, Burkhardtsdorf Labtech, Burkhardtsdorf
Spektralphotometer	NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen
Thermocycler	TGradient Thermocycler	Biometra, Göttingen
Thermocycler	GeneAmp PCR System 9600	Perkin Elmer, Norwalk
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
Ultrapure Water System	Elix	Millipore, Schwalbach
Vortex-Schüttler	Typ L 46	Gesellschaft für Laborbedarf, Würzburg
Waage	LC820	Sartorius, Göttingen
Zentrifugen		
- Zentrifuge	Megafuge 3.0 RS	Heraeus Instruments, Osterode/ Harz
- Kühlzentrifuge	1K15	Sigma, Osterode/ Harz
- Vakuumzentrifuge	Speedvac SC110	Savant Instruments, Farmingdale

## 3 Methoden

### 3.1 Kanzerogen-Behandlung

Ingezüchtete BDIV und BDIX Ratten sowie Ratten der kongenen Stämme (s. u.) erhielten 24 Stunden postnatal eine subkutane Einzelinjektion EtNU (80 µg/g Körpergewicht in McIlvaine-Puffer). Drei Monate nach der Kanzerogen-Exposition wurden die Tiere sorgfältig beobachtet. Tiere, die äußerlich sichtbare Tumoren, Kurzatmigkeit, Abmagerung, Lähmungen und/ oder Verhaltensabnormalitäten zeigten, wurden durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und untersucht. Maligne periphere Nervenscheidentumoren (MPNSTs) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in 4%iger Formalinlösung fixiert.

McIlvaine-Puffer (1000 ml, pH 6.0)

368 ml 0,1 M Citratmonohydrat

632 ml 0,2 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

### 3.2 Gewebeentnahme

Als Material für die DNA-Isolierung wurde den Ratten unter Narkose eine ca. 1 cm lange Schwanzbiopsie entnommen. Die Schwanzbiopsie wurde bis zur weiteren Verwendung (siehe 3.3.1) bei -20 C° gelagert. Um die Ratten für weitere Versuche identifizierbar zu machen, wurden sie mit einer Ohrlochzange nach einem labortypischen Schema markiert.

Zur Entnahme der *Nervi trigemini* wurden die Ratten durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet. Der intrakraniale Anteil des *Nervus trigeminus* wurde unter einem Stereo-Operationsmikroskop präpariert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren oder in 4%iger Formalinlösung fixiert. Von den bei -80 C° gelagerten *Nervi trigemini* wurden für die Immunhistochemie bzw. -fluoreszenz Gefrierschnitte angefertigt oder sie wurden für RNA-/ Proteinanalysen homogenisiert. Die in Formalin fixierten *Nervi trigemini* wurden in Paraffin eingebettet und für histologische Färbungen verwendet.

### **3.3 Genotypisierung**

#### **3.3.1 Isolierung von DNA aus Rattengewebe**

Die DNA wurde mittels zweier Methoden aus Rattengewebe isoliert. Während das DNeasy Tissue Kit™ zur DNA-Gewinnung für die engmaschige genomweite Genotypisierung (“Whole genome scan”) diente, wurde im übrigen die “Quick and Dirty”-Methode angewandt.

##### **3.3.1.1 DNeasy Tissue Kit™**

Die Isolierung der DNA aus der Schwanzbiopsie wurde nach Anweisung des Herstellers durchgeführt. Die Schwanzspitze (0,6 cm) wird in Lysis-Puffer mit Proteinase K aufgenommen und bei 55°C auf dem Thermomixer inkubiert, bis das Gewebe vollständig lysiert ist. Verbliebene feste Bestandteile werden anschließend 3 min bei 14.000 rpm abzentrifugiert und der Überstand wird zur Aufreinigung auf eine Säule gegeben. Hierbei bindet die DNA selektiv an die Silica-Gelmatrix. Nach einigen Waschschritten zur Eliminierung von Proteinen, divalenten Kationen etc. wird die DNA aus der Gelmatrix mit ddH<sub>2</sub>O (Ampuwa®) eluiert. Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration wurden die DNA-Lösungen mit ddH<sub>2</sub>O (Ampuwa®) auf 4 ng/μl verdünnt und bei -20°C gelagert.

##### **3.3.1.2 „Quick and Dirty“-Methode**

Ca. 0,3 cm der Schwanzbiopsie wird in 200 μl 50mM NaOH für 3 - 4 Stunden im Thermomixer bei 95°C lysiert. Das Lysat wird dann bei 14.000 rpm für 2 min zentrifugiert, der Überstand wird abgenommen und mit 20 μl 1M Tris Base (pH 5.0) neutralisiert. Die Fällung der DNA erfolgt durch Zugabe von 100 % Ethanol (3-faches Volumen der zu fällenden DNA-Lösung) über Nacht bei -80°C. Nach 15 min Zentrifugation bei 14.000 rpm und 4°C wird das DNA-Pellet bei RT für 15 min getrocknet und in 100 μl ddH<sub>2</sub>O (Ampuwa®) gelöst. Die DNA wird anschließend bei -20°C gelagert und in einer 1:10 Verdünnung in der PCR eingesetzt.

#### **3.3.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration und Reinheit der DNA wurden am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer photometrisch durch die Absorptionswerte bei einer Wellenlänge von 260 nm bzw. 280 nm bestimmt.

Die photometrische Bestimmung dient der Erfassung der Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren. Dabei wird die Extinktion im Wellenlängenbereich der Absorptionsmaxima von Nukleinsäuren und Proteinen gemessen. Nukleinsäuren haben aufgrund der aromatischen Ringsysteme ihrer Purine und Pyrimidine ein Absorptionsmaximum bei 260 nm; Proteine aufgrund von aromatischen Aminosäureresten bei 280 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz ist die Konzentration einer Lösung proportional zum dekadischen Logarithmus der Extinktion (0-1) und entspricht bei 260 nm und einem Strahlengang von 1 cm einer optischen Dichte von 1 bei 50 µg/ml (doppelsträngiger DNA), 40 µg/ml (einzelssträngiger DNA/ RNA) oder 33 µg/ml (Oligonukleotide).

Der Quotient  $OD_{260\text{ nm}} / OD_{280\text{ nm}}$  ist ein Maß für die Reinheit der Nukleinsäurelösung und soll für DNA bei 1,8 - 2,0 bzw. für RNA zwischen 1,9 - 2,2 liegen. Niedrigere Werte deuten auf verunreinigende, UV-absorbierende Stoffe hin (wie z. B. Proteine oder Phenole).

### **3.3.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Genotypisierung**

#### **3.3.3.1 Prinzip der Genotypisierung (Mikrosatelliten-Analyse mittels PCR)**

Die genotypische Charakterisierung der Ratten erfolgte unter Verwendung von Mikrosatellitenmarkern, die in der Literatur auch als „Short tandem repeats“ (STR), „Simple sequence length polymorphism“ (SSLP) oder „Simple sequence repeats“ (SSR) bezeichnet werden. Mikrosatelliten sind DNA-Sequenzen, bei denen sich Basenmotive, die 2 - 4 Basenpaare umfassen, tandemartig wiederholen. Am häufigsten finden sich STRs der Form  $(CA)_n$ . Die Anzahl (n) der Wiederholungen eines Motivs innerhalb eines Mikrosatellitenlocus variiert bei verschiedenen Individuen. Solche Längenpolymorphismen werden nach den Mendelschen Regeln vererbt, daher sind Mikrosatelliten als genetische Marker geeignet. Mikrosatelliten sind die häufigste Form repetitiver DNA. Im menschlichen Genom finden sich ca. 50.000 bis 100.000 solcher Mikrosatelliten. Die biologische Funktion von Mikrosatelliten ist nicht geklärt. Man vermutet, dass sie an der Regulation der Genexpression beteiligt sind. Die Inzuchtstämme BDIV und BDIX weisen für die verwendeten Mikrosatellitenmarker polymorphe Allele auf.

Die Mikrosatelliten-Analyse erfolgt mittels PCR (Polymerase Chain Reaction) (Saiki, Scharf et al. 1985). Man vermehrt mit dieser Methode kurze DNA-Abschnitte eines vorhandenen DNA-Templates, um die DNA des interessierenden Locus in ausreichender Menge für die gelelektrophoretische Analyse zur Verfügung zu haben.

### 3.3.3.2 Durchführung der PCR

Das PCR-Reaktionsgemisch (Endvolumen 10 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Menge
ddH <sub>2</sub> O (Ampuwa®)	2,16 µl
10-fach PCR-Puffer	1 µl
Primer „forward“ (10 µM)	0,3 µl
Primer „reverse“ (10 µM)	0,3 µl
dNTP Lösung (25 mM each dNTP)	1,2 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,04 µl
DNA (4 ng/µl / 1:10-Verdünnung)	5 µl

Die DNA-Verdünnung wurde in Mikrotiter-Platten (96er Format) vorgelegt und das PCR-Reaktionsgemisch dazu pipettiert. Um das Verdampfen des Reaktionsansatzes zu vermeiden wurde er mit Mineralöl abgedeckt. Die Reaktion fand in einem programmierten Thermocycler unter folgenden Bedingungen statt:

Schritt		Temperatur		Zyklen
1	Denaturierung	94°C	5 min	
2	Denaturierung	94°C	1 min	Schritt 2-4 38 mal
3	Annealing	55°C	1 min	
4	Elongation	72°C	1 min	
5	Elongation	72°C	10 min	

Die Amplifizierung der Mikrosatellitenmarker wurde für alle Primerpaare bei einer Primer-Annealingtemperatur von 55°C durchgeführt. Nach Beendigung des Programms wurde die PCR bei -20°C gelagert.

### 3.3.4 Nachweis des Mikrosatelliten-Amplifikats mittels Gelelektrophorese

#### 3.3.4.1 Prinzip der Gelelektrophorese (Größenfraktionierung von Nukleinsäuren)

Man verwendet zur Auftrennung von DNA-Fragmenten verschiedener Größe Trennmedien, meist aus gelierter Agarose oder polymerisiertem Acrylamid unterschiedlicher Konzentration. DNA-Moleküle wandern aufgrund ihrer negativen Ladung (bedingt durch Phosphatgruppen) im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Polyelektrolyte wie Nukleinsäuren tragen an jedem Monomer eine Ladungseinheit. Demnach tragen verschieden große Nukleinsäuren eine Ladung, die zu der jeweiligen Länge des Moleküls proportional ist.

Das Trennmedium, das wie ein Molekularsieb wirkt, hält große Fragmente jedoch länger zurück, während kleine Fragmente schneller durch das Gel von der Kathode zur Anode wandern können. Die von dem DNA-Fragment im Trennmedium zurückgelegte Laufstrecke ist umgekehrt proportional zum Logarithmus der Fragmentlänge.

### **3.3.4.2 Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese einzelsträngiger DNA**

Im unteren Molekulargewichtsbereich ist die Trennkapazität von Acrylamidgelen der von Agarosegelen überlegen. Acrylamidgele ermöglichen eine Auftrennung von Oligonukleotidfragmenten, die sich in ihrer Länge nur durch eine Base unterscheiden.

Das Gel für die Größenfraktionierung amplifizierter Mikrosatelliten-DNA besteht aus einer Matrix von Acrylamid, die mittels Bisacrylamid untereinander vernetzt ist. Die Vernetzung wird durch die Zugabe von APS und TEMED initiiert.

Die doppelsträngigen DNA-Fragmente werden durch Versetzung der Proben mit Formamid-Ladepuffer, Erhitzen und anschließendem sofortigem Abkühlen auf Eis in Einzelstränge überführt. Der denaturierte Zustand wird während der Elektrophorese durch Zugabe von Harnstoff in die Gellösung und Vorwärmen des Gels aufrecht erhalten, so dass die DNA-Einzelstränge vollständig entfaltet und ohne Sekundärstrukturen nach ihrer Größe aufgetrennt werden können.

#### *3.3.4.2.1 Herstellung und Beladung eines Polyacrylamidgels*

Zur Herstellung eines Polyacrylamidgels werden zwei gleich breite, aber unterschiedlich lange Glasplatten sorgfältig mit Wasser und Detergens gewaschen, mit destilliertem Wasser gespült und mit 70 % Ethanol abgewischt. Mit einem mit Sigmacote® befeuchteten Papiertuch (Kimwipe) beschichtet man die kleine Glasplatte unter dem Abzug, um das spätere Lösen dieser Platte vom Gel zu erleichtern. Die Platten werden aufeinandergelegt wobei sie durch zwei seitlich aufgelegte Plastikstreifen als Abstandhalter 0,4 mm auseinandergehalten werden. Dieses „Sandwich“ wird in den Gießrahmen eingespannt. Nach Zugabe von 140 µl 10%igem APS und 70 µl TEMED wird die Polyacrylamidgellösung (70 ml) mit einer Spritze langsam zwischen die Glasplatten gegossen, so dass Lufteinschlüsse vermieden werden. Dann wird zur Herstellung einer gleichmäßigen Gelkante ein Haifischzahnkamm mit der glatten Seite ca. 5 mm zwischen die Platten geschoben und die Oberkante des „Sandwichs“ mit mehreren Klammern gesichert. Das Gel wird 90 min zum Polymerisieren liegengelassen.

#### Polyacrylamidlösung (6 %)

150 ml 40%iges Bisacrylamid/ Acrylamid (19:1)

100 ml 10-facher TBE-Puffer

336 g Harnstoff

ad 1000 ml A. bidest.

#### 10-facher TBE-Puffer

108 g Tris Base

55 g Borsäure

40 ml EDTA 0.5M, pH8.0

ad 1000 ml A. bidest.

#### *3.3.4.2.2 Denaturierung der Proben*

Der PCR-Ansatz (10 µl) wird mit 5 µl Ladepuffer versetzt, im Heizblock bei 95°C 3 min erhitzt und anschließend sofort auf Eis inkubiert, um ein langsames Renaturieren bei RT zu verhindern.

#### Ladepuffer

0,5 ml 0.5 M EDTA

6 mg Xylencyanol FF

6 mg Bromphenolblau

in 24,5 ml Formamid lösen

#### *3.3.4.2.3 Elektrophorese*

Nachdem der Kamm entfernt wurde, wird das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt. Das untere und obere Reservoir der Kammer können nun mit je 400 ml 1-fachem TBE-Puffer befüllt werden. Das Gel wird bei 70 W 15 min vorgewärmt. Mit Hilfe einer Spritze wird der Harnstoff, der an der Geloberseite ausgetreten ist, weggespült. Nach Einpassung des Haifischzahnkamms werden 5 µl der Proben mit einer Achtkanal-Pipette aufgetragen. Die Elektrophorese wird bei 70 W für 90 min durchgeführt.

#### *3.3.4.2.4 Silberfärbung*

Das Gel wird (nach Entfernen der kleineren Glasplatte) auf der größeren Glasplatte waagrecht in einen Färberahmen eingespannt, so dass die Geloberfläche mit verschiedenen Lösungen (jeweils ca. 300 - 400 ml) inkubiert werden kann. Zur Fixierung der DNA im Gel wird das Gel 5 min in 10 % Ethanol inkubiert. Anschließend wird es 2 min in 1 % Salpetersäure neutralisiert, mit 0,3 % Silbernitratlösung für 20 min imprägniert, 1 - 2 min in

A. bidest. gewaschen und mit Natriumcarbonat-Formaldehyd-Lösung entwickelt. Zum Abstoppen der Färbereaktion wird das Gel 5 min in 10 % Essigsäure inkubiert und anschließend mit A. bidest. gewaschen. Zur Archivierung werden gefärbte Polyacrylamidgele auf Whatman Papier aufgenommen und auf einem Gelrockner getrocknet.

#### Entwicklerlösung

29,68 g Natriumcarbonat

512 µl Formaldehyd

ad 1000 ml A. bidest.

### **3.4 PCR zur Amplifikation des *Sry* Gens („Sex determining region of Y-Gen“)**

Mit spezifischen Primern für das *Sry* Gen auf dem Y-Chromosom der Ratte kann das Geschlecht bestimmt werden (An, Beauchemin et al. 1997).

Bei Männchen entsteht ein 240 bp langes PCR-Produkt, bei Weibchen dagegen nicht. Als Kontrolle wurde parallel eine PCR von DNA-Proben von Ratten, deren Geschlecht bekannt war, durchgeführt. Das PCR-Reaktionsgemisch (Endvolumen 20 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Menge
ddH <sub>2</sub> O (Ampuwa®)	12,32 µl
10-fach PCR-Puffer	2 µl
SRY „forward“ (10 µM)	0,6 µl
SRY „reverse“ (10 µM)	0,6 µl
dNTP Lösung (25 mM each dNTP)	2,4 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,08 µl
genomische DNA (50 ng/µl)	2 µl

Die Reaktion fand in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen statt:

Schritt		Temperatur		Zyklen
1	Denaturierung	94°C	3 min	
2	Denaturierung	94°C	45 s	Schritt 2-4 40 mal
3	Annealing	60°C	1 min	
4	Elongation	72°C	1 min	
5	Elongation	72°C	10 min	



### 3.5 Auftrennung von DNA in Agarosegelen

Im Gegensatz zur Polyacrylamid-Gelelektrophorese kann bei der Agarose-Gelelektrophorese eine gute Auflösung größerer DNA-Fragmente (von 0,1 kb bis zu 25 kb) erzielt werden. (Das Prinzip der Gelelektrophorese wird in Abschnitt 3.3.4.1. erläutert).

Zur Auftrennung und Visualisierung der Produkte der Amplifikation des *Sry* Gens („*Sex determining region of Y-Gen*“) wurden 2%ige (w/v) Agarosegele verwendet. Hierzu wird die erforderliche Agarosemenge in 1-fachem TAE-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen mit Ethidiumbromid (Endkonzentration: 0,5 µg/ml) versetzt. Danach wird die Lösung in einen Gelträger gegossen mit einem geeigneten Kamm, der beim späteren Entfernen die gewünschten Probenauftragstaschen hinterlässt versehen und bei RT abgekühlt. Das erstarrte Gel wird in eine mit 1-fachem TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer überführt, die Proben werden mit 6-fachem Probenpuffer versetzt und aufgetragen. Die Elektrophorese wird mit einer Spannung von 70 - 80 V durchgeführt. Durch das in die DNA interkalierte Ethidiumbromid werden die DNA-Fragmente unter UV-Licht als Banden sichtbar. Zur Dokumentation wurde das Agarosegel auf dem UV-Transilluminator mit einem Videosystem (Gel Doc 1000, Bio Rad) aufgenommen und ein Ausdruck des Bildes erstellt.

#### 6-facher Probenpuffer

0,05 % (w/v) Bromphenolblau

0,05 % (w/v) Xylencyanol

60 % (w/v) Sucrose

#### 50-facher TAE-Puffer

Tris Base                      242 g

Essigsäure                    57,1 ml

0,5 M EDTA pH 8.0        100 ml

ad 1000 ml A. dest.

### 3.6 Sequenzanalyse

Um mögliche Unterschiede in den kodierenden bzw. nicht kodierenden Sequenzen (z. B. im Promotorbereich) der Kandidatengene der Rattenstämme zu erkennen, muss für das jeweilige Gen in beiden Stämmen die Basensequenz bestimmt und die Nukleotidabfolge untereinander verglichen werden.

### **3.6.1 Prinzip der Sequenzierung**

Die Sequenzierreaktion wurde mit dem ABI PRISM® Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) durchgeführt, das auf einem modifizierten Verfahren der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger basiert. Das sogenannte „Cycle-Sequencing“ ist methodisch von der PCR abgeleitet. Die zu sequenzierende DNA wird als Matrize eingesetzt. Im Gegensatz zur PCR wird hier nur ein Primer benötigt, der nach Denaturierung des Doppelstrangs an einen Einzelstrang bindet und somit den Startpunkt für die DNA-Synthese darstellt. Die DNA-Polymerase baut die ihr zur Verfügung gestellten Nukleotide in den neuen Strang ein. Der Nukleotid-Mix besteht aus dNTPs und ddNTPs. Wird ein ddNTP von der DNA-Polymerase als Substrat verwendet, kann die DNA-Kette an dieser Position wegen des Fehlens einer 3'-OH-Gruppe nicht weiter verlängert werden, so dass es zum Kettenabbruch kommt. Nach thermischer Denaturierung kann erneut ein Primermolekül an die Matrize binden und der Vorgang von Elongation und Kettenabbruch wiederholt werden. Dadurch entstehen stochastisch an jeder Position Kettenabbrüche und somit DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. Die Elektrophorese der denaturierten Ansätze in einem Polyacrylamidgel ermöglicht die Auftrennung von Fragmenten mit einem Unterschied von nur einer Base. Infolge der unterschiedlichen Fluoreszenzmarkierung der vier ddNTPs kann die Sequenz anhand der verschiedenen fluoreszierenden Banden ermittelt werden. Die Auftrennung und Auswertung der Sequenzierungsprodukte erfolgte mit dem Sequenzierautomat ABI 373A DNA Sequencer und der dazugehörigen Software.

### **3.6.2 Durchführung der Sequenzierung**

Die Sequenzierung der kodierenden DNA-Sequenzen (Exons) erfolgte auf genomischer Ebene oder über die Isolierung von RNA und anschließender RT-PCR.

#### **3.6.2.1 PCR von genomischer DNA**

Die genomische DNA dient nicht unmittelbar als DNA-Template für die Sequenzierreaktion. Vielmehr wird zunächst eine PCR von genomischer DNA mit den für die Sequenzierung verwendeten Primern durchgeführt, um das zu sequenzierende DNA-Fragment in ausreichender Menge und ohne unspezifische Nebenprodukte zur Verfügung zu haben.

Das PCR-Reaktionsgemisch (Endvolumen 100 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Menge
ddH <sub>2</sub> O (Ampuwa®)	80,1 µl
10-fach PCR-Puffer	10 µl
Primer „forward“ (10 µM)	3 µl
Primer „reverse“ (10 µM)	3 µl
dNTP Lösung (25 mM each dNTP)	1,5 µl
Taq Polymerase (5 U/µl)	0,4 µl
genomische DNA (50 ng/µl)	2 µl

Die Reaktion fand in einem Thermocycler unter folgenden Bedingungen statt:

Schritt		Temperatur		Zyklen
1	Denaturierung	93°C	3 min	
2	Denaturierung	93°C	40 s	Schritt 2-4 30 mal
3	Annealing	56-67°C	1 min	
4	Elongation	72°C	2 min	
5	Elongation	72°C	10 min	

Annealingtemperatur der Primer (siehe Anhang 3)

Die PCR-Produkte wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe 3.5).

### 3.6.2.2 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Der experimentelle Umgang mit RNA ist wegen des schnellen Zerfalls der RNA bedingt durch ubiquitär vorkommenden RNasen problematisch. RNA ist im Vergleich zu DNA chemisch wesentlich instabiler und temperaturempfindlicher. Hinzu kommt, dass bei der Amplifikation von DNA mittels PCR spezifische DNA-Polymerasen verwendet werden, welche DNA abhängig sind, d. h. sie sind nicht in der Lage, RNA zu amplifizieren. Daher wird zuerst eine reverse Transkriptase (RT) eingesetzt, eine RNA abhängige DNA-Polymerase, mit deren Hilfe RNA in cDNA umgeschrieben werden kann. Die cDNA kann im Anschluss als Ausgangsprodukt in einer PCR verwendet werden, um spezifische Sequenzen aus dieser zu amplifizieren.

#### 3.6.2.2.1 Gesamt-RNA Isolierung aus Rattengewebe

Für die Sequenzierung der Kandidatengene auf cDNA-Ebene wurde aus verschiedenen Geweben (Leber, Lunge, Hoden und Gehirn) RNA isoliert. Die Auswahl der Gewebe orientierte sich an Expressionsstudien, die in der Expressions-Datenbank GNFSymAtlas

v.0.8.0 (<http://symatlas.gnf.org/SymAtlas>) zusammengefasst sind. Die RNA Isolierung wurde mit dem RNeasy Mini Kit™ durchgeführt. Hierbei wird zuerst das Gewebe in einem Lysepuffer aufgenommen und mit einem Polytron-Homogenisator zerkleinert. Der Lysepuffer enthält Substanzen, die eine sofortige Inaktivierung aller RNAsen bewirken. Die Zugabe von Ethanol schafft günstige Bindungsbedingungen, die eine anschließende Säulenaufreinigung ermöglichen, mit der die RNA durch spezifische Bindung an eine Matrix herausgefiltert wird. Die an die Säule gebundene RNA wird mit einem speziellen Puffer gewaschen und mit RNase freiem Wasser aus der Matrix eluiert. Nach photometrischer Bestimmung der Konzentration kann diese nun bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert werden. Der genaue Ablauf der einzelnen Schritte kann dem betreffenden Handbuch entnommen werden.

#### 3.6.2.2.2 RT-PCR zur Amplifikation von Kandidatengenfragmenten aus RNA

In dieser Arbeit wurde das OneStep RT PCR KIT™ der Firma Qiagen verwendet, das eine reverse Transkription und anschließende PCR in einem Ansatz ermöglicht. Hierzu dient eine Enzymmischung, die sowohl zwei verschiedene reverse Transkriptasen, als auch eine DNA-Polymerase enthält. Der RT-PCR Mastermix (Endvolumen 25 µl) setzte sich wie folgt zusammen:

Bestandteil	Menge
RNase freies Wasser	x µl
5-fach PCR-Puffer	5 µl
Primer „forward“(10 µM)	1,5 µl
Primer „reverse“(10 µM)	1,5 µl
dNTP Lösung	1 µl
RT-PCR Enzym-Mix	1 µl
RNA	x µl

Die Mengen der jeweiligen RNA und somit auch die des RNase freien Wassers variieren mit der Endkonzentration der isolierten RNA, die je nach Gewebe unterschiedlich ist. Eingesetzt wurden die RNAs der Gewebe, die für das jeweilige Gen die höchste anzunehmende Expression, basierend auf den Expressionsdaten der Gendatenbank GNFSymAtlas v.0.8.0 (<http://symatlas.gnf.org/symAtlas>) erwarten ließ.

Die RT-PCR lief unter folgenden Bedingungen ab:

Schritt		Temperatur		Zyklen
1	RT-Reaktion	50°C	30 min	
2	Aktivierung der Polymerase	95°C	15 min	
3	Denaturierung	94°C	5 min	
4	Denaturierung	94°C	1 min	Schritt 4-6 30 mal
5	Annealing	56-67°C	1 min	
6	Elongation	72°C	1 min	
7	Elongation	72°C	10 min	

#### 3.6.2.2.3 Reamplifikation von Kandidatengenfragmenten

Die RT-PCR dient zur Amplifizierung von spezifischen Transkripten aus einer gegebenen RNA. Liegen die entsprechenden Amplifikate jedoch nicht in ausreichender Menge vor, ist es möglich durch eine PCR mit den gleichen spezifischen Primern ein bestimmtes Fragment aus einem RT-PCR Produkt zu reamplifizieren. Hierzu wird eine Standard-PCR mit den RT-PCR Produkten als Template durchgeführt (siehe 3.6.2.1).

#### 3.6.2.3 Aufreinigung der PCR-Produkte und Sequenzierreaktion

Sofern die PCR-Produkte keine unspezifischen Beibanden aufwiesen, wurden sie mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit™ (Qiagen) von Nukleotiden, Primern, Polymerasen und Salzen gereinigt.

PCR-Produkten mit unspezifische Beibanden wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit™ (Qiagen) aufgereinigt. Hierzu werden die spezifischen Banden aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in Pufferlösung aufgenommen.

Sowohl das QIAquick Gel Extraction Kit™ als auch das QIAquick PCR Purification Kit™ basiert auf der selektiven Bindung der DNA an Silica-Gelmatrix in Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Bezüglich der Zusammensetzung der Lösungen werden vom Hersteller keine Angaben gemacht. Der genaue Ablauf der einzelnen Schritte kann dem betreffenden Handbuch entnommen werden.

Für die Sequenzierung wurde der ABI PRISM™ Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers mit sequenzspezifischen Primern unter folgenden Bedingungen:

Schritt		Temperatur		Zyklen
1	Denaturierung	96°C	30 min	
2	Denaturierung	96°C	10 min	Schritt 2-4 25 mal
3	Annealing	56°C	5 s	
4	Elongation	60°C	4 min	

#### 3.6.2.4 Aufreinigung des Sequenzierprodukts

Nach der Sequenzierreaktion müssen alle fluoreszierenden Bestandteile aus dem Mix entfernt werden, die nicht den gewünschten Fragmenten entsprechen. Die Säulenaufreinigung der Produkte der Sequenzier-PCR erfolgte mit Hilfe des DyeEx 2.0 Spin Kit™ (Qiagen) gemäß den Angaben des Herstellers. Dieses Kit besteht aus kleinen Säulen mit einer Gelmatrix (Sephadex) und entsprechenden 2 ml Probengefäßen zum Auffangen der eluierten DNA. Zunächst wurde die noch trockene Gelmatrix mit A. dest. versetzt und 30 min quellen gelassen. Dann wurde der Säulenverschluss am Boden entfernt, die Säule in ein 2 ml Probengefäß gesetzt und 2 min bei 2300 rpm zentrifugiert. Die Säule wird in sauberes Probengefäß gesetzt und das gesamte Volumen der Sequenzierreaktion auf die Mitte des Gels pipettiert. Es folgte eine weitere Zentrifugation von 3 min bei 2300 rpm, um die DNA von der Säule in das Probengefäß zu eluieren. Nicht in die DNA eingebaute fluoreszierende Nukleotide dringen auf Grund ihrer kleinen Molekülgröße in die Säulengelmatrix ein und werden nicht eluiert.

#### 3.6.2.5 Detektion und Auswertung der Sequenzen

Die Analyse erfolgte auf dem ABI 373A DNA Sequencer (Applied Biosystems). Hierzu wurden die Proben auf ein Sequenziergel aufgetragen. Die detektierten Sequenzen wurden mit der entsprechenden Software (373A Analysis V1.1.1, Data collection V1.1.1 ) ausgewertet.

Die Referenzsequenzen wurden aus der Reference Sequence Database (NCBI) (<http://www.ncbi.nih.gov/RefSeq/>) bezogen.

### 3.7 Expressionsanalyse auf RNA-Ebene

#### 3.7.1 RNA-Präparation

Die RNA wurde mit Hilfe des RNeasy® Mini Kit (Qiagen) nach den Vorgaben des Herstellers isoliert (siehe 3.6.2.2.1). Der Erfolg der Präparation wurde mittels Gelelektrophorese auf einem 2%igen Agarosegel (siehe 3.5) überprüft und quantifiziert.

### **3.7.2 cDNA-Synthese**

2 - 3 ng RNA wurden mit Hilfe des SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen) in einem Reaktionsvolumen von 10 µl mit Random-Hexamerprimern nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben.

### **3.7.3 Quantitative Real-Time-PCR**

#### **3.7.3.1 Prinzip der quantitative Real-Time-PCR**

Die quantitative Real-Time-PCR stellt eine Weiterentwicklung der PCR dar. Im Vergleich zur Endpunkt-PCR, bei der DNA-Produkte qualitativ nachgewiesen werden können, wurde es durch Entwicklung der quantitativen Real-Time-PCR möglich, Aussagen über die Ausgangs-DNA-Menge zu machen. Die Messung erfolgt über einen interkalierenden, fluoreszierenden Reporterfarbstoff (z. B. SYBRGreen), wobei die Fluoreszenz proportional zur Produktmenge ansteigt. Am Anfang der PCR-Reaktion wird nur die Basis- oder Hintergrundfluoreszenz gemessen, da die Produktfluoreszenz aufgrund der geringen Templatekonzentration im Reaktionsgefäß während der ersten PCR-Zyklen normalerweise nicht detektierbar ist. Die Quantifizierung der DNA-Menge beruht nicht auf absoluten Mengen an PCR-Produkt, sondern auf der Kinetik der PCR-Reaktion. Dafür nimmt man als Richtlinie den C<sub>T</sub>-Wert (Threshold Cycle = „Schwellenwert-Zyklus“), da zu diesem Zeitpunkt die Amplifikation exponentiell ist und es in dieser Phase der PCR-Reaktion keine limitierenden Faktoren (wie z. B. Primer- oder Nukleotidmangel, nachlassende Enzymaktivität) gibt.

#### **3.7.3.2 Durchführung der quantitative Real-Time-PCR**

Für die Durchführung der quantitativen Real-Time-PCR wurde der Platinum®SYBR®GreenqPCR SuperMix UDG (Invitrogen) verwendet und dabei gemäß dem Protokoll des Herstellers verfahren. Jeweils 1 µl der cDNA wurde mit 24 µl eines Reaktionsgemisches bestehend aus 12,5 µl Platinum®SYBR®GreenqPCR SuperMix, 0,5 µl Rox, dem jeweiligen Primerpaar gemäß Tabelle 3.1 und ad 24 µl ddH<sub>2</sub>O (Ampuwa®) versetzt.

Tabelle 3.1: Primerpaare für die Real-Time-PCR

Gen	Primer	Konzentration	Menge
<i>GAPDH</i>	GAPDH-F	5 nM	0,5 µl
	GAPDH-R	5 nM	3 µl
<i>Akt1</i>	AKT-F2	10 nM	1 µl
	AKT-R2	10 nM	1 µl
<i>Pten</i>	PTEN-F1	10 nM	1 µl
	PTEN-R1	10 nM	1 µl

Die quantitative Real-Time-PCR erfolgte mit Hilfe des ABI PRISM® 7700 Sequence Detection System. Folgende Zyklusparameter wurden verwendet:

Schritt		Temperatur		Zyklen
1	Denaturierung	95°C	5 min	
2	Denaturierung	93°C	40 s	Schritt 2-3 40 mal
3	Annealing/ Elongation	60°C	1 min	

### 3.7.3.3 Relative Quantifizierung: Vergleichende Ct-Methode

Nach der vergleichenden Ct-Methode wurden die Ct-Werte für das „Housekeeping gen“ *GAPDH* (*Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase*) und das zu untersuchende Gen bestimmt (Fink, Seeger et al. 1998). Zur Normalisierung wurde der Ct-Wert des *GAPDH* vom Ct-Wert des zu untersuchenden Gens abgezogen. Dieser Ct-Wert bildete den normalisierten Expressionswert des Gens in der untersuchten Probe:

$$\Delta Ct = Ct (\text{Ziel-cDNA}) - Ct (GAPDH)$$

## 3.8 Expressionsanalyse auf Proteinebene

### 3.8.1 Westernblot

#### 3.8.1.1 Lyse der Gewebe und Bestimmung der Proteinkonzentration

Das Gewebe (ca. 0,5 cm des *Nervus trigeminus*) wurde in 300 µl Lysepuffer homogenisiert (Polytron-Homogenisator), 30 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 14.000 rpm und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und analysiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte entweder photometrisch am NanoDrop® ND-1000 Spectrophotometer bei einer Wellenlänge von 280 nm oder mit dem DC-Protein-Assay (Bio-Rad).



#### Lysepuffer für die Detektion der Akt1/ Pten Proteine:

10 mM Tris HCl (pH 7.4)  
1 mM Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>)  
1 mM EGTA  
0.5 mM CHAPS  
10 % Glycerin  
50 mM Natriumfluorid  
100 µM Natriumvanadat  
1 mM Benzamidin  
5 µg/ml Leupeptin

#### Lysepuffer für die Detektion des „Estrogen receptor beta“:

##### 1000 µl Lysepuffer

930 µl Saline-Tris-Puffer (ST-Puffer)  
50 µl NP40 (10 % v/v in ST-Puffer)  
20 µl „Complete Protease-Inhibitoren-Cocktail“ (Roche)

##### ST-Puffer

10 mM Tris Base  
140 mM NaCl  
Der pH wird mit NaOH auf 7.5 eingestellt.

### **3.8.1.2 Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

#### *3.8.1.2.1 Prinzip der diskontinuierlichen SDS-Page*

Das Prinzip der Gelelektrophorese wurde bereits im Abschnitt 3.3.4.1 beschrieben. Bei der SDS-PAGE werden Proteine entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Durch Inkubation der Proteine mit SDS und einem Überschuß an Reduktionsmittel (z. B. DTT, 2-Mercaptoethanol), welches die intermolekularen Disulfidbrücken löst, werden diese vollständig denaturiert und dissoziiert. Das SDS bindet an hydrophobe Regionen der Proteine. Die stark negative Ladung von SDS nivelliert alle Ladungen der Proteine, so dass im Ergebnis alle Proteine nahezu gleich stark negativ geladen sind.

Eine Auftrennung von Proteinen in Abhängigkeit von ihrer Länge setzt deren Fokussierung in scharfe Zonen („Banden“) voraus. Um Proteine aus Probenvolumina von 10 - 50 µl in

scharfe Banden auftrennen zu können, führte Laemmli 1970 die diskontinuierliche SDS-Gelelektrophorese ein. Dabei werden ein Sammelgel und ein Trenngel eingesetzt. Das Sammelgel hat die Aufgabe, die Proteine an der Front zum Trenngel zu konzentrieren. Im kleinporigen Trenngel erfolgt die Auftrennung nach dem Molekulargewicht.

#### 3.8.1.2.2 Durchführung der SDS-Page

Es wurden 4%ige Sammelgele und 12%ige Trenngele verwendet. 30 µg gelöstes Protein der zu analysierenden Proben wurden mit 4-fach konzentriertem Probenpuffer versetzt und 1 h bei RT inkubiert, danach 5 min bei 96°C denaturiert, 5 min auf Eis inkubiert und schließlich auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 120 V für 2 h in Elektrophoresepuffer durchgeführt.

<u>12%iges Trenngel</u>		<u>4%iges Sammelgel</u>	
Lösung A	1,5 ml	Lösung D	1 ml
Lösung C	5,1 ml	Lösung C	1 ml
20%iges SDS	60 µl	A. dest.	4 ml
A. dest.	3,84 ml	10% APS	80 µl
10% APS	80 µl		

#### Lösung A

Tris Base	91,5 g
1 M HCl	120 ml
TEMED	0,575 ml
ad 250 ml A. dest., pH 8,5 einstellen	

#### Lösung C

Acrylamide-Bis (29:1) 30% (w/v)

#### Lösung D

1 M Tris HCl pH 7.0	38,4 ml
20%iges SDS	1,6 ml
TEMED	0,1 ml

#### 4-facher Probenpuffer (25ml)

Tris Base (pH 6.8)	0,76 g
Glycerin	10 ml
SDS	2,3 g
DTT	0,77 g
Bromphenolblau	0,01 %
ad 25 ml A. dest.	

#### 4-facher Laufpuffer

Tris Base	60 g
Glycin	288 g
20%iges SDS	100 ml
ad 5 l A. dest., pH 8.5 einstellen	

### **3.8.1.3 Westernblotting**

#### *3.8.1.3.1 Prinzip der Westernblotting-Methode*

Der Transfer von Proteinen aus Polyacrylamidgelen auf eine Polyvinylidenfluorid-(PVDF) Membran erfolgte elektrophoretisch (Towbin, Staehelin et al. 1979). Dabei wird ein elektrisches Feld senkrecht zur ursprünglichen Laufrichtung angelegt, wodurch die Proteine aus der Gelmatrix in Richtung der Membran laufen und dort gebunden werden. Beim Semi-dry Blot werden Gel und Membran sandwichartig von Whatman Papieren umschlossen, die bei der Elektrophorese als Ionen-Reservoir dienen (Abbildung 3.1). Methanol im Puffer dient dazu, das SDS aus den Protein-Detergens-Komplexen zu entfernen und die Bindung der SDS-freien Proteine an die Membran zu erhöhen.

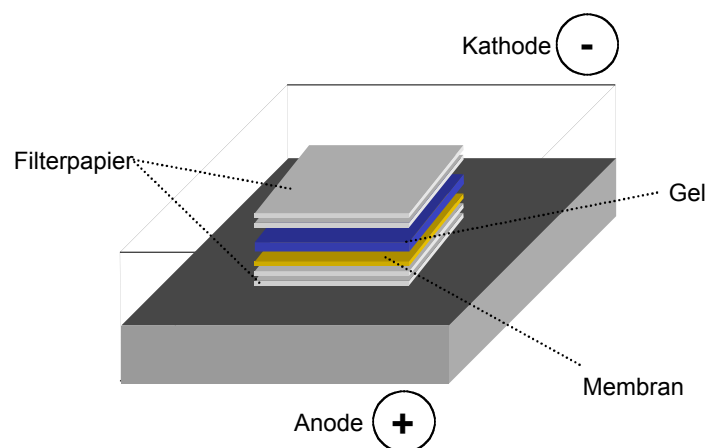


Abbildung 3.1: Westernblot-Apparatur

#### 3.8.1.3.2 Durchführung der Westernblotting-Methode

Der Transfer erfolgte bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  Stapelfläche für 45 min. Die PVDF Membran wurde zuvor 15 s in Methanol aktiviert und 5 min in Blotpuffer equilibriert. Das Polyacrylamidgel wurde währenddessen in Leitungswasser gewässert.

Der Erfolg des Transfers war anhand des aufgetragenen, gefärbten Proteingewichtsmarkers (SeeBlue® Plus2) erkennbar.

#### 3.8.1.4 Immundetektion

##### 3.8.1.4.1 Prinzip der Immundetektion

Die Detektion von Antigenen erfolgt durch einen spezifischen Antikörper dessen Bindung indirekt über die Reaktion des an den Zweitantikörper gekoppelten Enzyms Meerrettichperoxidase (HRP) nachgewiesen wird. Bei der Umsetzung des entsprechenden Substrats kommt es zur Emission von Chemilumineszenz. Hierfür wurde das ECL (Enhanced Chemiluminescence) Detektionssystem (Amersham) verwendet.

##### 3.8.1.4.2 Durchführung der Immundetektion

Die PVDF Membran wurde nach dem Transfer zunächst für mindestens 1 h mit 5 % Milchpulver in TBST (Blockierungslösung) bei Raumtemperatur (RT) blockiert. Der primäre Antikörper wurde in Blockierungslösung verdünnt (Akt1 (2H10) von NEB 1:1000, Pten (26H9) von NEB 1:1000, Estrogen Receptor Beta (SP5198P) von Acris 1:1000, Anti- $\beta$ -Actin (AC-74) von Sigma-Aldrich 1:5000); ebenso der sekundäre Antikörper (Anti-Kaninchen 1:1000, Anti-Maus 1:3000 beide von GE Healthcare). Die Menge an Antikörperlösung wurde so gewählt, dass die Membran in einem ihrer Größe entsprechenden Glasgefäß mit Flüssigkeit vollständig bedeckt war. Die Inkubation mit dem Erstantikörper erfolgte bei  $4^\circ\text{C}$  über Nacht [bzw. 1 h bei RT für Anti- $\beta$ -Actin (AC-74)]. Nach dem Entfernen der Antikörperlösung wurde die Membran drei Mal mit TBST für je 5 min gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen. Beim Antigen-Nachweis mittels des ECL-Detektionssystems wurde sodann der HRP-gekoppelte Zweitantikörper 1 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit TBST wurde die Membran für 1 min mit ECL-Reagenz bedeckt. Anschließend wurde in einer Dunkelkammer die Chemilumineszenz durch Exposition der Membran auf sensitiven Filmen (HyperFilm) detektiert.

### Blotpuffer

Tris Base	5,82 g
Glycin	2,94 g
Methanol	200 ml
20%iges SDS	1,88 ml
ad 1000 ml A. dest.	

### 10-fache TBS (Tris Buffered Saline)

Tris Base	24,2 g
Natriumchlorid	80 g
ad 1000 ml A. dest., auf pH 7.6 einstellen.	

### TBST

1-fache TBS mit 0,2 % Tween®-20

## **3.8.2 Histologische Färbungen**

### **3.8.2.1 Vorbehandlung des Gewebes**

Um ein strukturelles Äquivalentbild des vitalen Zustandes bei der histologischen Aufarbeitung zu erzielen, muss die Autolyse des Gewebes verhindert werden.

Die Fixierung von Geweben verhindert durch Inaktivierung lysosomaler Enzyme die Autolyse und unterbindet das Wachstum von Bakterien und Pilzen, die ebenfalls Abbauprozesse verursachen können. Zugleich stabilisiert es Zellen und Gewebe, so dass diese vor mechanischen Verletzungen während des Färbeprozesses geschützt sind.

Die Fixierung ist nicht unproblematisch. Ein Gewebe besteht bis zu 80 % aus Flüssigkeit und der Wasseranteil wird bei der Fixierung durch das Fixativ ersetzt. So kommt es infolge von osmotischen Veränderungen durch die Fixierungslösung oft zu Schrumpfungen.

Ein ideales Fixativ sollte möglichst den natürlichen Bedingungen eines lebenden Gewebes bezüglich pH-Wert, Osmolarität und Ionenkonzentration entsprechen, wobei tatsächlich nur die Anforderung an den pH-Wert erfüllbar ist. 4%ige Formalinlösung enthält daher ein neutrales Salz zur Erhaltung der Tonizität und ein Puffersystem zur Aufrechterhaltung des pH-Werts. Oft verändert der pH-Wert die enzymatischen oder antigenen Eigenschaften des Gewebes, weshalb möglichst ein neutraler pH-Wert angestrebt werden sollte.

#### 3.8.2.1.1 *Fixierung mit Formaldehyd*

Formaldehyd, das ein gängiges Fixativ ist, reagiert primär mit basischen Aminosäuren, wobei es zur Bildung vernetzender „Methylenbrücken“ kommt. Dadurch ist die Permeabilität für Makromoleküle relativ gering und die Struktur intrazytoplasmatischer Proteine wird nicht signifikant verändert.

##### Fixierungslösung (4%iges Formalin, gepuffert, 10 l)

65 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$

40 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

ad 9 l A. dest.

1 l 37 % Formalin

#### 3.8.2.1.2 *Einbettung in Paraffin und Anfertigung der Paraffinschnitte*

Die in 4%iger Formalinlösung fixierten Gewebe (siehe 3.2) wurden in einen Einbettungsautomat (Tissue-Tek® VIP 2000) automatisch in Paraffin eingebettet.

Die in Paraffin eingebetteten Gewebe wurden parallel zur Messerkante in das Rotationsmikrotom (Microm) eingespannt. Die Schnittstärke wurde auf 4  $\mu\text{m}$  eingestellt. Die Gewebeschnitte wurden in ein Wasserbad (ca. 50°C) überführt, damit sie sich strecken können. Zudem erleichtert dieser Schritt das Aufziehen auf einen Objektträger. Bei 37°C wurden die so erstellten Gewebeschnitte getrocknet.

#### 3.8.2.1.3 *Anfertigung der Gefrierschnitte*

Bei -80°C gelagerte Gewebe wurden an einem Gefriermikrotom (Microm) bei -20°C geschnitten. Eine Fixierung des Gewebes vor dem Schneiden, wie bei der Paraffinhistologie ist nicht erforderlich. Die Schnittdicke betrug 8  $\mu\text{m}$ . Die Gefrierschnitte wurden direkt auf SuperFrost®Plus Objektträger (Menzel) aufgenommen, zur Fixierung über Nacht bei RT gelagert (getrocknet) und anschließend entweder zur Aufbewahrung bei -80°C in Alufolie eingepackt oder direkt gefärbt.

### 3.8.2.2 **Prinzip der Immunfärbung**

Immunfluoreszenz und immunhistochemische Techniken beruhen auf dem Prinzip der Bindung eines spezifischen Antikörpers an das darzustellende Antigen in einem Gewebeschnitt oder in Zellkultur. Die Erkennung von Gewebsantigenen kann durch die Fixierung beeinträchtigt werden. Postfixative Behandlungen (z. B. partielle Proteolyse oder hitze-

induzierte Antigendemaskierung) können das Gewebe aufschliessen und verdeckte Determinanten freilegen (Antigendemaskierung).

Zur Lokalisierung von Antigenen setzt man entweder direkt einen farbstoffmarkierten oder biotinylierten Erstantikörper ein oder verwendet einen Zweitantikörper, der den Erstantikörper detektiert.

Bei der ABC-Methode ist dieser sekundäre Antikörper biotinyliert. An das Biotin bindet ein ABKomplex, d. h. ein Komplex von an Avidin und Biotin konjugierter Meerrettichperoxidase (HRP). Die Peroxidase und somit auch das Antigen werden mit Hilfe des Chromogens Diaminobenzidin (DAB) sichtbar gemacht. Dabei kommt es zu einer Signalverstärkung, da Avidin mehrere Biotinmoleküle binden kann und zudem der Antikörper mit mehreren Biotinmolekülen konjugiert sein kann. Dies macht es möglich, dass makromolekulare Komplexe aus Avidin und biotinylierten Enzymen entstehen (Abbildung 3.2).

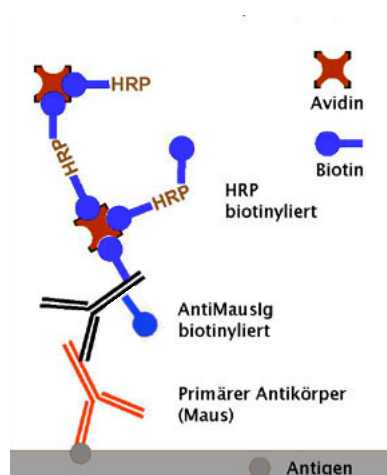


Abbildung 3.2: ABC-Methode (Avidin-Biotin-Methode)

Neben biotinylierten Zweitantikörpern kann man auch fluoresceinmarkierte (z. B. Cy3, DTAF) Antikörper verwenden, um das Antigen indirekt im Fluoreszenzmikroskop sichtbar zu machen. Die Immunfluoreszenz erlaubt es, einen Gewebeschnitt gleichzeitig mit mehreren Antikörpern gegen unterschiedliche Antigene zu färben und somit Kollokalisierungen von Antigenen nachzuweisen.

### 3.8.2.3 Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit der Avidin-Biotin-Methode und 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) an Paraffinschnitten

Die Gewebeschnitte wurden zur Entparaffinierung 2 x 5 min in Xylol und 2 x 5 min in 100 % Ethanol inkubiert. Danach wurden sie durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (2 x 5 min in 90 % Ethanol, 5 min in 70 % Ethanol, 5 min in 50 % Ethanol und 1 min in ddH<sub>2</sub>O).

Bei der anschließenden Mikrowellenbehandlung wurden die Epitope demaskiert. Dazu wurden die Gewebeschnitte in zuvor kochenden 0,01 M Citratpuffer pH 0,6 in der Mikrowelle kurz aufgekocht, 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert und wieder kurz in der Mikrowelle aufgekocht. Insgesamt wurden sie 3x aufgekocht. Zum Abkühlen wurden die Gewebeschnitte ca. 30 min bei RT belassen und dann für 1 min in ddH<sub>2</sub>O, 5 min in PBS mit 0,5 % Triton X-100 und 1 min in PBS gewaschen. Sämtliche Waschschrte wurden in Küvetten mit den dazugehörigen Ständern bei RT durchgeführt. Zur Absättigung freier Bindungsstellen (Verhinderung unspezifischer Antikörperbindung) wurden die Gewebeschnitte für 1 h in PBS mit 10 % Eselserum (Dianova) bei 4°C inkubiert. Hierzu wurden sie vorher mit einem Fettstift umrandet, damit der gesamte Gewebeschnitt gleichmäßig mit Lösung bedeckt werden konnte und zudem die Lösung nicht auf dem Objektträger verlaufen konnte. Um Evaporationseffekte zu verhindern, erfolgte die Inkubation in feuchten Kammern. Die Blockierungslösung wurde dann vollständig entfernt und direkt die primäre Antikörperlösung hinzugegeben. Der Antikörper ER beta 503 aus dem Huhn wurde dazu im Verhältnis 1:100 in PBS mit 1 % FCS verdünnt. Pro Gewebeschnitt wurden dabei 100 - 200 µl Antikörperlösung verwendet, so dass das Gewebe vollständig mit der Lösung bedeckt war. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Die Antikörperlösung wurde abgeschüttet und die Gewebeschnitte für 5 min in PBS, 2 x 5 min in PBS mit 0,5 % Triton X-100 und 5 min in PBS gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden dann 1 h bei RT mit der sekundären Antikörperlösung inkubiert. Der biotin-gekoppelte spezie-spezifische Zweitantikörper (Anti-Huhn IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, Dianova) wurde dazu im Verhältnis 1:500 in PBS mit 2 % Rattenserum (Dianova) verdünnt. Danach wurde die Lösung mit dem sekundären Antikörper abgeschüttet und die Schnitte wurden 5 min in PBS, 2 x 5 min in PBS mit 0,5 % Triton X-100 und 5 min in PBS gewaschen. Die Inkubation mit der ABC-Lösung (DAKO) erfolgte im Dunkeln für 1 ½ h bei Raumtemperatur. Die Lösung wurde (mindestens 30 min vor dem Gebrauch) wie folgt angesetzt: Lösung A und Lösung B wurden jeweils im Verhältnis 1:100 in PBS mit 1 % FCS verdünnt. Nach Abschütten der Lösung wurden die Gewebeschnitte 2 x 5 min in PBS mit 0,5 % Triton X-100 und 5 min in PBS gewaschen. Anschließend wurde die DAB-Lösung, die gemäß den Angaben des Herstellers verwendet wurde, auf die Gewebeschnitte gegeben und ca. 8 min im Dunkeln belassen (bis die Braunfärbung auftrat). Die Reaktion wurde durch Abschütten der Lösung gestoppt. Die Schnitte wurden im Folgenden kurz in Leitungswasser gestellt, 5 min in PBS gewaschen, mit Hämatoxylin gegengefärbt und über eine aufsteigende Alkoholreihe (2 min 70 % Ethanol, 5 min 95 % Ethanol, 2 x 5 min 100 % Ethanol) entwässert. Darauf folgte die Entfernung des absoluten Alkohols in einem



Zwischenmedium (2 x 5 min in Xylol). Anschließend wurden die Gewebeschnitte in Tissue-Tek® eingebettet und unter dem Mikroskop betrachtet.

#### **3.8.2.4 Durchführung der immunhistochemischen Färbung mit der Avidin-Biotin-Methode und 3'3'-Diaminobenzidin (DAB) an Gefrierschnitten**

Die kryokonservierten trockenen Gewebeschnitte wurden zunächst auf Raumtemperatur (RT) gebracht und 10 min in Aceton, das zuvor mindestens 30 min bei -20°C vorgekühlt worden war, fixiert. Danach wurden sie 5 min bei RT getrocknet. Die Blockierung erfolgte in 5 % BSA in PBS (1 h bei 4°C). Nach Abschütten der Blockierungslösung wurde der Gewebeschnitt über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper (ER beta 503 1:100 in PBS mit 1 % FCS) inkubiert. Es folgten drei Waschschrte (10 min PBS, 15 min PBS mit 0,1 % NP 40 und 5 min PBS). Zur Detektion des primären Antikörpers folgte eine 40-minütige Inkubation mit einem biotin-gekoppelten spezie-spezifischen Zweitantikörper (Anti-Huhn IgG (H+L) F(ab')<sub>2</sub>-Fragment, Dianova) in der Verdünnung 1:500 bei RT. Nach erneutem Waschen (5 min PBS, 5 min PBS mit 0,1 % NP 40 und 5 min PBS) folgte die Inkubation mit dem Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex gemäß dem Protokoll des Herstellers (siehe 3.7.2.3). Es folgten drei Waschschrte (3 x 5 min) in PBS. Als Substrat für die Peroxidase diente 3'3'-Diaminobenzidin (DAB)-Lösung (Sigma), die nach Angaben des Herstellers verwendet wurde. Die Gewebeschnitte wurden nach Gegenfärbung mit Hämatoxylin, aufsteigender Alkoholreihe und Xylol-Behandlung mit Tissue-Tek® eingebettet.

#### **3.8.2.5 Durchführung der Immunfluoreszenzfärbung des Er beta Proteins und der Immunzellenmarker**

Zur Doppel-Fluoreszenzfärbung mit den Antikörpern gegen Er beta und CD4, CD8, ED1, ED2 oder TCR wurden die kryokonservierten trockenen Gewebeschnitte zunächst auf RT gebracht und 10 min in Aceton, das zuvor mindestens 30 min bei -20°C vorgekühlt worden war, fixiert. Dann wurden sie 5 min bei RT getrocknet. In dieser Zeit wurde der Gewebeschnitt auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet, sodass bei den Inkubationsschritten die Lösungen nicht ablaufen konnte und eine sichere Inkubation mit genügend hoher Antikörperkonzentration gewährleistet war. Unspezifische Bindungen wurden mit 5 % BSA in PBS 1 h bei 4°C blockiert. Alle Inkubationsschritte wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt, um eine Austrocknung der Schnitte zu vermeiden. Die Inkubation mit dem primären Antikörper ER beta 503 erfolgte in einer Verdünnung von 1:100 in PBS mit 1 % FCS über Nacht bei 4°C. Am folgenden Tag wurde die Gewebeschnitte 10 min in PBS

gewaschen und mit dem zweiten Erstantikörper in ihrer entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 3.2) in 1 % FCS in PBS 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.

Tabelle 3.2: Verdünnung der Erstantikörper.

Erstantikörper	Verdünnung
ER beta 503	1:100
Mouse Anti Rat CD4	1:150
Mouse Anti Rat CD8 alpha	1:100
Mouse Anti Rat CD68 (ED1)	1:250
Mouse Anti Rat CD163 (ED2)	1:100
Mouse Anti Rat TCR alpha/ beta	1:100

Parallel zu jedem Versuch wurden Kontrollen durchgeführt. Die Kontrollgewebeschnitte wurden mit keinem Erstantikörper, sondern lediglich mit 1 % FCS in PBS inkubiert. Ziel war es die Hintergrundfärbung des Zweitantikörpers zu kontrollieren.

Es folgten 3 Waschschrte (15 min in PBS, 15 min in PBS mit 0,1 % NP-40 und 15 min in PBS). Alle Waschschrte erfolgten in Küvetten auf dem Schüttler. Zur Markierung des ER beta 503 wurde ein biotin-gekoppelter spezie-spezifischer Zweitantikörper (Anti-Huhn IgG (H+L) F(ab') 2-Fragment, Dianova) in einer Verdünnung von 1:500 in PBS verwendet (1 h bei RT). Nach einem 30-minütigen Waschschrte in PBS erfolgte eine weitere einstündige Inkubationsphase mit DTAF (Dichlorotriazinylaminofluoreszein) markiertem Streptavidin (Verdünnung 1:500 in PBS mit 1 % FCS) sowie mit einem Anti-Maus Cy3 (Carbocyanin 3) gekoppeltem Sekundärantikörper (Esel IgG, F(ab') 2-Fragment, Dianova) in der Verdünnung 1:500 in PBS mit 1 % FCS. Nach einem 20-minütigen Waschschrte in PBS erfolgt die Kernfärbung mit 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) (1:100 000 in PBS) im Dunkeln für 5 min. Anschließend wurden erneut drei Waschschrte in PBS für je 5 min durchgeführt.

Die Schnitte wurden nun mit Fluoromount G (Biozol) überzogen und mit Deckgläsern versehen. Bis zur Auswertung wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4°C gelagert.

### 3.8.3 Markscheidenfärbung mit Luxol Fast Blue

#### 3.8.3.1 Prinzip der Markscheidenfärbung mit Luxol Fast Blue

Das Myelin der Schwann Zellen ist eine komplexe Substanz aus Protein, Phospholipid, Cholesterin und Zerebrosid, die durch die Paraffineinbettung zum großen Teil herausgelöst wird. Übrig bleibt ein als Neurokreatin bekanntes Lipoprotein, das – histologisch betrachtet – das Neurokreatingerüst bildet. Der Farbstoff Luxol Fast Blue, ein Kupfer-Phthalozyanin, zeigt

spezifische Affinität für Neurokreatin, sodass sich damit leicht eine Färbung der Markscheide durchführen lässt (Kluver and Barrera 1953).

### **3.8.3.2 Durchführung der Markscheidenfärbung mit Luxol Fast Blue**

Die Paraffinschnitte werden in 95 % Alkohol entparaffiniert und über Nacht in Luxolblau-Färbelösung inkubiert. Darauf folgt ein Waschschrift in 95 % Alkohol und zweimaliges Spülen in A. dest. Nach kurzem Eintauchen der Schnitte in 0,05 % Lithiumcarbonatlösung folgt eine weitere Differenzierung in 70 % Alkohol für 20 - 30 s. Dann werden die Schnitte in A. dest. gespült. Ist die Differenzierung nicht stark genug, ist das Eintauchen der Schnitte in Lithiumcarbonatlösung und Alkohol zu wiederholen. Nach dem Abspülen in A. dest. werden die Gewebeschnitte 2 min in Hämatoxylin nach Böhmer zur Färbung der Zellkerne inkubiert, kurz in A. dest. und für 15 s in Ammoniakwasser gespült. Nach 5 min Bläuen in Leitungswasser wird das Zellplasma 10 min mit Eosin gefärbt. Zum Entwässern werden die Gewebeschnitte kurz in 100 % Alkohol, 5 min in Isopropanol sowie in Xylol inkubiert und schließlich mit Tissue-Tek® eingedeckt.

#### Luxolblau-Färbelösung

Luxol fast blue 1 g

Ethanol (95 %) 1000 ml

Essigsäure (96 %) 0,5 ml

#### Ammoniakwasser

15 Tropfen Ammoniak auf 200 ml A. dest.

### **3.8.4 Fluoreszenzmikroskopie und Auswertung der Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen**

Der fluoreszierende DNA-Farbstoff DAPI bzw. die mittels Immunfluoreszenz markierten Antigene in den Gewebeschnitten der *Nervi trigemini* wurden mit Hilfe des Fluoreszenzmikroskops Axio Imager.Z1 von Zeiss und der dazugehörigen Axio Vision Software sichtbar gemacht.

Für die Auszählung der antigenpositiven Zellen wurde jeweils der rechte untere Gewebeabschnitt an der Nerv-Hirn-Grenze ausgewählt (Abbildung 3.3).

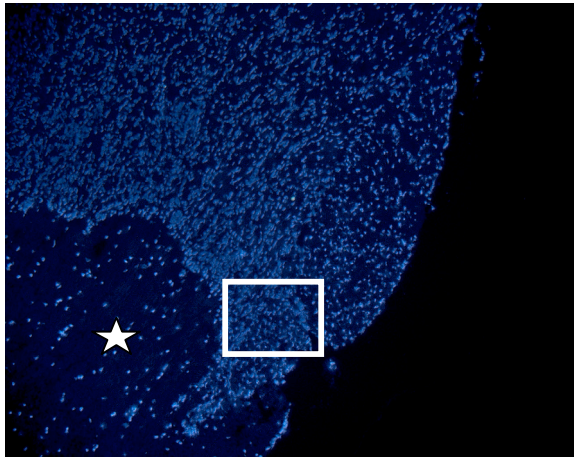


Abbildung 3.3: Bildausschnitt des *Nervus trigeminus* an der Nerv-Hirn-Grenze (DAPI-Färbung). Der Kasten gibt die Position an, in der die Zellkerne der Schwann- und Immunzellen gezählt wurden (☆ Gehirn).

Dieser Bereich wurde mit dem 40er Objektiv fokussiert und für jede Fluoreszenz (DAPI, Cy3 und DTAF) wurde ein digitales Bild erstellt. Über diese 3-Fluoreszenzaufnahme wurde in Photoshop ein Raster gelegt, das aus 7 x 5 Kleinquadraten (à 2,9 cm x 2,9 cm) bestand. In jedem Kleinquadrat wurde die Anzahl der

- Schwann Zellen, die nur DAPI gefärbt waren,
- Schwann Zellen, die Er beta positiv waren,
- Immunzellen, denen eindeutig ein nur DAPI gefärbter Zellkern zugeordnet werden konnte,
- und Immunzellen, denen eindeutig ein Er beta positiver Zellkern zugeordnet werden konnte, ermittelt.

## 3.9 Kongene Rattenstämme

### 3.9.1 Prinzip

Die Züchtung kongener Rattenstämme wird zur Übertragung von Chromosomen, Chromosomenabschnitten oder einzelnen Genen zwischen verschiedenen Inzuchtstämmen eingesetzt. Die von George Snell (Snell 1948) entwickelte Methode ermöglicht es bei einem polygenen Erbgang die Wirkung eines einzelnen krankheitsassoziierten Locus auf das Merkmal abzuschätzen und durch weitere Rückkreuzungen den Genort feinzukartieren. Sowohl bei der Ratte als auch bei der Maus stellt gegenwärtig die Züchtung kongener Stämme die Standard-Methode für den Transfer von Ziel- oder Transgenen in einen definierten genetischen Hintergrund dar. Das traditionelle Protokoll zur Zucht eines kongenen Stammes erfordert zwischen 8 und 12 Rückkreuzungsgenerationen, gefolgt von einer Kreuzung heterozygoter

Tiere, um Nachkommen zu erhalten, die am gewünschten Genort homozygot sind (Wakeland, Morel et al. 1997; Kreutz and Hubner 2002).

Um die Anzahl der benötigten Generationen und damit die Zeitspanne zur Etablierung eines kongenen Stammes zu verkürzen, wurden sogenannte markerunterstützte Selektionsprotokolle [„Marker-assisted selection protocols“ (MASPs)] entwickelt. Basierend auf der genomweiten Analyse von Polymorphismen, die Spender- und Empfängerstamm voneinander unterscheiden, erfolgt die Zucht nachfolgender Generationen im Gegensatz zum traditionellen Protokoll, gezielt. Dabei ist die Auswahl der Tiere nicht nur vom Vorhandensein des zu übertragenden genetischen Abschnitts, sondern auch von der Abwesenheit kontaminierender Gene/Fragmente des Spenderstammes abhängig. Mit dieser Methode reduziert sich die Anzahl der nötigen Rückkreuzungsgenerationen von ursprünglich mindestens 8 auf 4 bis 5. Da diese Verringerung somit auch mit einer Halbierung der benötigten Zeit einhergeht, werden diese gezielt gezüchteten Tiere auch als „Speed congenics“ bezeichnet (Wakeland, Morel et al. 1997).

### **3.9.2 Züchtung nach der „Speed congenics“ Methode**

Die das Tumorrisiko modulierenden Effekte der Loci *Mss1*, *Mss2*, *Mss4* und *Mss7* sind allelspezifisch. Wir haben den BDIV Stamm als Spenderstamm und den BDIX Stamm als Empfängerstamm verwendet, da uns in dieser Konstellation die Effekte besser messbar erschienen. Denn bei solchen kongenen Stämmen sollte die Inzidenz der PNS Tumoren gegenüber dem 90%igen Auftreten beim Rezipientenstamm BDIX in statistisch signifikanter Weise geringer ausfallen. Zunächst wurde ein Empfängerstamm-Männchen mit einem Spenderstamm-Weibchen zum Erhalt einer F<sub>1</sub> Generation verpaart. Die aus dieser Verpaarung resultierenden F<sub>1</sub> Tiere weisen im gesamten Genom einen heterozygoten Genotyp auf und sind damit untereinander genetisch identisch. Zudem ist bei allen F<sub>1</sub> Männchen das Y-Chromosom BDIX fixiert. Da schon früher gezeigt werden konnte, dass Imprinting keine Rolle bei der Vererbung von Suszeptibilität/ Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese spielt, war die Wahl des Geschlechts in dieser Hinsicht zum Aufbau der kongenen Linien nicht entscheidend (Kindler-Rohrborn, Kolsch et al. 1999).

Zur weiteren gezielten Züchtung wurde ein beliebiges F<sub>1</sub> Männchen mit Weibchen des Empfängerstammes (BDIX) zum Erhalt einer Rückkreuzungsgeneration verpaart. Da ein Männchen mit mehreren Weibchen gleichzeitig verpaart werden kann, wurden für die genetischen Untersuchungen zunächst nur Männchen ausgewählt. Die männlichen Jungtiere der ersten Rückkreuzungsgeneration wurden mittels polymorpher Mikrosatellitenmarker auf das

zu übertragende Fragment untersucht. Dieses wird relativ groß gewählt (zunächst wird das gesamte Chromosom selektiert), da das Fragment mit jeder Generation durch „Crossing over“ kleiner werden kann. Bei Tieren, die auf dem gesamten zu übertragenden Chromosom einen heterozygoten Genotyp aufwiesen, wurde anschließend das übrige Genom mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern getestet. Dieser „Genome scan“ wurde mit den zu diesem Zeitpunkt verfügbaren polymorphen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt (siehe Anhang 2). Das Männchen, das an den meisten Markerpositionen (mit Ausnahme des zu übertragenden Chromosoms) den für den Empfängerstamm homozygoten Genotyp aufwies, wurde für die weitere Züchtung verwendet. Mit den auf die erste Rückkreuzung folgenden Generationen wurde nach demselben Schema verfahren, wobei sich der zu testende genetische Hintergrund auf die verbliebenen heterozygoten Marker der Vorgängergeneration verringerte.

Wenn Ratten homozygote BDIX Allele für alle polymorphen Mikrosatelliten aufwiesen, die in dem relativ groben „Genome scan“ des genetischen Hintergrundes getestet wurden, wurde eine engmaschiger genomweite Genotypisierung polymorpher Mikrosatellitenmarker („Whole genome scan“) durchgeführt, um zuvor unentdeckte Fragmente aus dem BDIV Genom zu identifizieren und gegebenenfalls durch eine weitere Rückkreuzung zu eliminieren.

Diese Ratten wurden dann direkt untereinander verpaart oder nochmals mit BDIX rückgekreuzt, um genügend Ratten für Bruder-Schwester-Verpaarungen zur Verfügung zu haben. Bruder-Schwester-Verpaarungen dienen dazu, Ratten mit einem homozygoten Spenderfragment zu generieren. Die auf diese Weise erzeugten Jungtiere wurden auf das gewünschte Fragment getestet. Durch weitere Bruder-Schwester-Verpaarung der entsprechenden Tiere wurde der Stamm etabliert und erhalten.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Inzidenz und relatives Risiko der Entstehung von MPNSTs bei (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Ratten in Abhängigkeit von Geschlecht und Genotyp für Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10 (*Mss7*)

Um sowohl den Erbgang zu bestimmen als auch Gene zu lokalisieren, die Prädisposition und Resistenz gegenüber der Tumorentstehung vermitteln, war bereits vor Beginn der Arbeiten für meine Dissertation eine (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Generation in beiden Orientierungen gezüchtet und mit Ethylnitrosoharnstoff (EtNU) behandelt worden. 47 Männchen und 31 Weibchen von insgesamt 268 (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Tieren, die am ersten Postnataltag mit EtNU behandelt wurden, entwickelten MPNSTs (maligne periphere Nervenscheidentumoren). Auf der Basis der Genotypisierungsdaten dieser 268 F<sub>2</sub> Ratten mit 144 Mikrosatellitenmarkern waren 7 genomische Regionen auf den Chromosomen 1 (*Mss2*), 3 (*Mss3*), 6 (*Mss4*), 10 (*Mss1* und *Mss7*), 13 (*Mss5*) und 15 (*Mss6*) identifiziert worden, die auf allelspezifische Weise mit Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der Tumorentstehung im peripheren Nervensystem assoziiert sind.

Wenn die Interaktion zwischen Geschlecht und Genotyp als Kovariate verwendet wurde, zeigte der Locus *Mss4* (Kernregion der Assoziation beim Marker *D6Mit1*) im logistischen Regressionsmodell eine starke Wechselwirkung mit dem weiblichen Geschlecht. Um dies zu visualisieren, wurde die Anzahl von erkrankten F<sub>2</sub> Männchen und Weibchen mit den Genotypen IV/IV, IV/IX und IX/IX für die Mikrosatellitenmarker *D6Mgh5*, *D6Mit1* und *D6Ngb* auf Chromosom 6 verglichen und das relative Risiko der einzelnen Gruppen ermittelt. So konnte gezeigt werden, dass homozygote BDIV Allele im *Mss4* Locus Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese im peripheren Nervensystem (PNS) bei weiblichen Tieren vermitteln. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass in der (BDIX x BDIV) x BDIX Rückkreuzung, in der homozygote BDIV Allele nicht vorkommen können, kein geschlechtsspezifischer Effekt beobachtet werden konnte. Durch eine Analyse der Haplotypen erkrankter F<sub>2</sub> Weibchen konnte der Locus *Mss4* auf einen Bereich, der vom Marker *D6Mgh5* bis *D6Ngb* reicht, eingengt werden (Koelsch, Fischer et al. 2005).

Der Einfluss des Locus *Mss7* (Chromosom 10) auf die Inzidenz von MPNSTs (Kernregion der Assoziation beim Marker *D10Mgh12*) wird deutlich, wenn sowohl männliche als auch weibliche F<sub>2</sub> Tiere berücksichtigt werden. Die geschlechtsgetrennte Analyse der Daten mit dem logistischen Modell zeigte nur geringe Effekte für den Locus *Mss7* bei Weibchen. Um

auch mögliche schwächere geschlechtsspezifische Effekte erkennen zu können, wurde für diesen Locus ebenfalls die Inzidenz von MPNSTs in Abhängigkeit von Geschlecht und Genotyp bestimmt, bzw. das relative Risiko der Gruppen ermittelt.

Bei (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Weibchen konnte dadurch ein ähnlicher Effekt der BDIV Allele im *Mss7* Locus wie beim *Mss4* Locus auf Chromosom 6 aufgedeckt werden (Tabelle 4.1). Nur ein F<sub>2</sub> Weibchen von 23 (4%) mit homozygoten IV/IV Allelen für den Mikrosatellitenmarker *D10Mgh12* entwickelte ein MPNST, während 28% der heterozygoten Weibchen und 20% der Weibchen mit homozygoten IX/IX Allelen erkrankten. Dies entspricht einem 6.33- bzw. 4.6-fach erhöhtem Tumorrisiko der letzten beiden Gruppen im Vergleich zum Genotyp IV/IV. Bei männlichen (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Tieren zeigte sich nur eine schwache Abhängigkeit der Tumorzinzidenz vom Genotyp für den Marker *D10Mgh12*. Das Tumorrisiko von F<sub>2</sub> Männchen mit IV/IX und IX/IX Allelen steigt um das 1.24- bzw 1.65-fache.

Tabelle 4.1: Erkrankungshäufigkeiten männlicher und weiblicher (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Tiere mit den Genotypen: IV/IV, IV/IX und IX/IX für die Marker *D10Mgh25*, *D10Mgh12* und *D10Mgh11* auf Chromosom 10.

Geschlecht	Männchen			Weibchen		
Marker Position in Mb	Genotyp			Genotyp		
	IV/IV	IV/IX	IX/IX	IV/IV	IV/IX	IX/IX
<i>D10Mgh25</i> 5,09	8 <sub>a</sub> (30) <sub>b</sub> 27% <sub>c</sub>	30 (67) 45%	9 (25) 36%	2 (28) 7%	19 (74) 26%	10 (43) 23%
		1.68 <sub>d</sub> 0.88 – 3.22 <sub>e</sub>	1.35 0.61 – 2.98		3.59 0.89 – 14.44	3.26 0.77 – 13.76
<i>D10Mgh12</i> 19,1	10 (33) 30%	23 (61) 38%	14 (28) 50%	1 (23) 4%	22 (80) 28%	8 (40) 20%
		1.24 0.68 – 2.29	1.65 0.87 – 3.12		6.33 0.9 – 44.44	4.6 0.61 – 34.49
<i>D10Mgh11</i> 29,97	16 (38) 42%	17 (50) 34%	9 (21) 44%	4 (26) 15%	11 (55) 20%	12 (36) 33%
		1.0 0.60 – 1.7	1.02 0.55 – 1.89		1.3 0.46 – 3.7	2.17 0.79 – 5.97

<sub>b</sub> Anzahl aller F<sub>2</sub> Tiere mit identischem Geschlecht und Genotyp - <sub>a</sub> Anzahl der davon erkrankten F<sub>2</sub> Tiere - <sub>c</sub> Prozentsatz der erkrankten F<sub>2</sub> Tiere - <sub>d</sub> relatives Risiko MPNSTs zu entwickeln im Vergleich zum Genotyp IV/IV - <sub>e</sub> Konfidenzintervall

Stellt man die Haplotypen der 30 erkrankten weiblichen (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Ratten (vgl. rechter Teil der vorstehenden Tabelle 4.1) für die Marker auf Chromosom 10 in einem Diagramm zusammen, fehlt beim Marker *D10Mgh12* die Allelkombination IV/IV fast



vollständig, während sie bei den benachbarten Mikrosatellitenmarkern *D10Mgh25* und *D10Mgh11* vorkommt (Abbildung 4.1). Das einzige F<sub>2</sub> Weibchen, das trotz homozygoter BDIV Allele im *Mss7* Locus ein MPNST entwickelte, ist das Weibchen Nr. 43. Interessanterweise, hat dieses Weibchen ebenfalls am *Mss4* Locus homozygote BDIV Allele. Das Weibchen Nr. 43 scheint ein Sonderfall zu sein, bei dem der/ die Resistenz vermittelnde(n) Mechanismus(en) von homozygoten BDIV Allelen am *Mss4* und/ oder *Mss7* Locus nicht greift.

Wenn man davon ausgeht, dass homozygote BDIV Allele im Locus *Mss7* Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese von PNS Tumoren vermitteln, sollten diese nicht in der entsprechenden Region bei erkrankten Tieren zu finden sein. Dies ermöglichte eine Einengung des Locus auf den Marker *D10Mgh12* einschließlich der auf beiden Seiten flankierenden Sequenzen, d. h. auf ca. 25 Mb.

Mb	5,09	19,1	29,97	36,25	36,65	41,35
Marker	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>
TierNr	<i>Mgh25</i>	<i>Mgh12</i>	<i>Mgh11</i>	<i>Mgh10</i>	<i>Mit4</i>	<i>Mit3</i>
1	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
10	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
24	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
26	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
39	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IX
40	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX
43	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV
60	IV/ IX	IV/ IX	na	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
70	IV/ IX	IV/ IX	na	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
85	IV/ IX	IV/ IX	na	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV
88	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IV	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
93	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
104	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
106	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
119	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
123	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
124	IV/ IV	IV/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
142	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
143	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
151	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
165	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
173	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
198	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV	IV/ IV
225	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
230	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
251	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
252	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
264	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
275	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IX/ IX
276	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX

Abbildung 4.1: Verteilung der Genotypen der getesteten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10 bei erkrankten weiblichen F<sub>2</sub> Tieren. Dargestellt sind die Genotypen der erkrankten F<sub>2</sub> Weibchen im Bereich der Marker *D10Mgh25* bis *D10Mit3*.

## 4.2 Keine Interaktion der Loci *Mss4* und *Mss7* bei der Vermittlung von Tumorresistenz bei Weibchen

Die Loci *Mss4* und *Mss7* üben Haupteffekte bei der Tumorresistenz von Weibchen aus. Daher war es wichtig zu klären, ob sie interagieren oder unabhängig voneinander wirken.

Das Kombinationsschema (Tabelle 4.2) zeigt, dass 22 von 23 Weibchen, die am Marker *D10Mgh12* (*Mss7*) homozygote BDIV Allele tragen, keinen Tumor entwickelten, unabhängig von ihrem Genotyp am Locus *Mss4* (*D6Mit1*). 40 von 41 Weibchen mit dem Genotyp IV/ IV am Locus *Mss4* (*D6Mit1*) waren ebenfalls nicht erkrankt, wiederum unabhängig von ihrem Genotyp am Locus *Mss7* (*D10Mgh12*). Das F<sub>2</sub> Weibchen Nr. 43 ist das einzige Weibchen, das ein MPNST entwickelte obwohl es homozygote BDIV Allele für den Marker *D6Mit1* hat und darüber hinaus auch für *D10Mgh12*.

Wenn man davon ausgeht, dass das Tier Nr. 43 einen Sonderfall darstellt, so veranschaulicht das Kombinationsschema (Tabelle 4.2), dass homozygote BDIV Allele für mindestens einen dieser beiden Loci ausreichen, um bei Weibchen Tumorresistenz zu vermitteln.

In Hinblick auf Tumorsuszeptibilität, die von BDIX Allelen vermittelt wird, könnten die beiden Loci interagieren, da weibliche F<sub>2</sub> Tieren, die sowohl am Locus *Mss4* als auch am Locus *Mss7* heterozygote Allele tragen, ein erhöhtes Tumorrisiko besitzen.

Tabelle 4.2: Die Loci *Mss4* und *Mss7* vermitteln unabhängig voneinander Tumorresistenz bei weiblichen F<sub>2</sub> Tieren.

		<i>D10Mgh12</i> ( <i>Mss7</i> )		
		IV/IV	IV/IX	IX/IX
<i>D6Mit1</i> ( <i>Mss4</i> )	IV/IV	<b>1<sub>a</sub> (9)<sub>b</sub></b> <b>11%<sub>c</sub></b> 0.0-48.2 <sub>d</sub>	<b>0 (20)</b> 0.0% 0.0-16.1	<b>0 (12)</b> 0.0% 0.0-24.5
	IV/IX	<b>0 (9)</b> 0.0% 0.0-33.6	15 (36) 44% 27.1-57.8	4 (17) 24% 9.6-47.3
	IX/IX	<b>0 (5)</b> 0.0% 0.0-52.2	6 (23) 26% 12.5-46.5	3 (10) 33% 10.0 -60.3

<sub>a</sub> Anzahl der erkrankten (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Weibchen mit den Genotypen IV/IV, IV/IX oder IX/IX für den Mikrosatellitenmarker *D6Mit1* in Kombination mit den Genotypen IV/IV, IV/IX oder IX/IX für den Marker *D10Mgh12* - <sub>b</sub> Anzahl aller F<sub>2</sub> Tiere mit dem entsprechenden Genotyp - <sub>c</sub> Prozentsatz der erkrankten Weibchen von allen F<sub>2</sub> Tieren mit den entsprechenden Genotyp - <sub>d</sub> Konfidenzintervall

### 4.3 Feinkartierung zur weiteren Einengung der Loci *Mss4* und *Mss7*

Die Loci *Mss4* und *Mss7* umfassten 34,8 Mb [vom Marker *D6Mgh5* (76,38 Mb) bis *D6Ngb* (111,2 Mb)] (Abbildung 4.2) bzw. 24,88 Mb [vom Marker *D10Mgh25* (5,09 Mb) bis *D10Mgh11* (29,97 Mb)] (Abbildung 4.1). Um die Anzahl möglicher Kandidatengene, die die Tumoresistenz bei Weibchen vermitteln, zu reduzieren, sollten die Loci weiter eingengt werden.

Mb	7,68	14,62	38,0	52,75	76,38	98,84	111,2	112,27	123,2	127,68	133,08	134,09	138,3
Marker	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>
Tier Nr.	<i>Wox10</i>	<i>Rat47</i>	<i>Rat33</i>	<i>Rat132</i>	<i>Mgh5</i>	<i>Mit1</i>	<i>Ngb</i>	<i>Rat66</i>	<i>Cpg1a</i>	<i>Mgh3</i>	<i>Mgh2</i>	<i>Rat110</i>	<i>Mgh14</i>
1	IV/IX	IV/IV	IV/IX	na	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na
10	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX
24	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
26	IV/IX	IV/IV	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
39	IV/IX	IV/IV	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
40	IV/IV	IV/IV	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IV	IV/IV	IV/IV
43	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV
60	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IV	IV/IV	IV/IV
70	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
85	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	na
88	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
93	IV/IV	IV/IV	IV/IX	na	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
104	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
106	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
119	IX/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
123	IV/IX	IV/IV	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
124	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
142	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
143	IV/IX	IV/IX	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
151	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
165	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
173	IV/IX	IV/IX	IX/IX	na	IX/IX	IX/IX	IX/IX	na	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
198	na	na	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IX/IX	IV/IX	IV/IX
225	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
230	IX/IX	IX/IX	IX/IX	na	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
251	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	na	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
252	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	na	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
264	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
275	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
276	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Abbildung 4.2: Verteilung der Genotypen der getesteten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 6 bei erkrankten weiblichen F<sub>2</sub> Tieren. Dargestellt sind die Genotypen der erkrankten (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Weibchen im Bereich der Marker *D6Wox10* bis *D6Mgh14* auf Chromosom 6.

Eine engmaschigere Genotypisierung im Bereich der Marker *D6Mgh5* bis *D6Ngb* bzw. *D10Mgh25* bis *D10Mgh11* bei den erkrankten (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Weibchen Nr. 143 und 198 (*Mss4*) sowie Nr. 39, 85, 88, 124 und 198 (*Mss7*), die an diesen Markern Rekombinationspunkte besitzen, könnte eine weitere Einengung der Loci ermöglichen (Abbildung 4.2: *Mss4* und Abbildung 4.1: *Mss7*). Dies erforderte jedoch zunächst die Suche nach neuen polymorphen Mikrosatellitenmarkern in den Bereichen zwischen den Markern *D6Mgh5* bis *D6Ngb* und *D10Mgh25* bis *D10Mgh11*.

#### 4.3.1 Suche nach diskriminierenden Mikrosatelliten in den Bereichen zwischen den Markern *D6Mgh5* bis *D6Ngb* (*Mss4*) und *D10Mgh25* bis *D10Mgh11* (*Mss7*)

Mit Hilfe der öffentlichen Datenbank „Rat Genome V3.1 at RGD“ des „Baylor College of Medicine (HGSC)“ Projekts wurden 54 bzw. 31 Mikrosatelliten in den Bereichen zwischen den Markern *D6Mgh5* bis *D6Ngb* und *D10Mgh25* bis *D10Mgh11* ausgewählt und experimentell geprüft, ob die Allele der Rattenstämme BDIV und BDIX unterschiedlich lang sind, d. h. polymorph sind (Abbildung 4.4 und 4.5).

So zeigte die Mikrosatelliten-Analyse mittels PCR mit anschließender Auftrennung der PCR-Produkte im Polyacrylamidgel und Silberfärbung identische Bandenmuster für die Stämme BDIV und BDIX für den Marker *D10Rat110*, im Gegensatz zu dem Marker *D10Rat51* bei dem das BDIV Allel kürzer als das BDIX Allel ist (Abbildung 4.3).

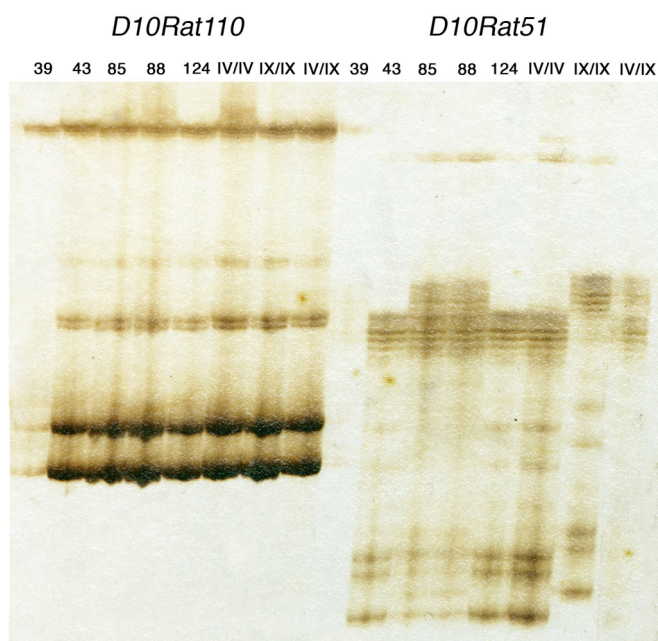
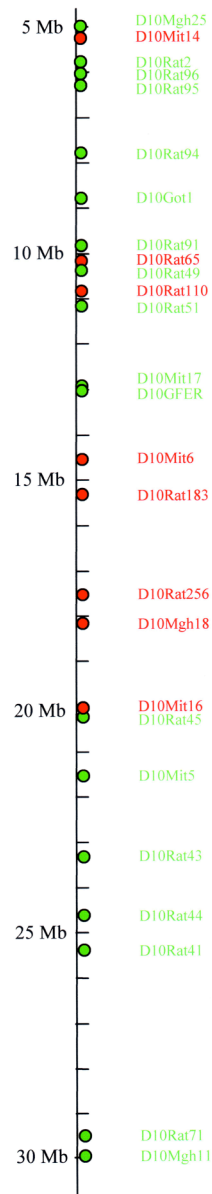


Abbildung 4.3: Nachweis des Mikrosatelliten-Amplifikats der Marker *D10Rat110* und *D10Rat51*. Als DNA-Template diente genomische DNA der F<sub>2</sub> Tiere Nr. 39, 43, 85, 88, 124 und von BDIV (IV/IV), BDIX (IX/IX) und F<sub>1</sub> Tieren (IV/IX).



Abbildung 4.4: Schematische Darstellung des Chromosoms 6 der Ratte im Bereich der Marker *D6Mgh5* bis *D6Ngb* (*Mss4*) mit den physikalischen Positionen der ausgewählten und in Bezug auf die BD Stämme IV und IX als polymorph oder nicht polymorph charakterisierten Mikrosatellitenmarker (grün: polymorphe Allele für BDIV und BDIX, rot: nicht polymorph für BDIV und BDIX, schwarz: nicht auswertbare Marker).

# *Mss7*



Marker	Position in Mb	Marker für die Haplotypenanalyse
D10Mgh25	5,09	•
D10Mit14	5,33	
D10Rat2	5,82	
D10Rat96	6,17	
D10Rat95	6,38	•
D10Rat94	7,81	•
D10Got1	8,7	•
D10Rat91	9,76	•
D10Rat65	10,205	
D10Rat49	10,38	•
D10Rat110	10,86	
D10Rat51	11,21	•
D10MEFV	12,06	
D10Mit17	12,96	
D10GFER	13,08	•
D10Mit6	14,72	
D10Rat183	15,27	
D10Rat64	17,29	
D10Rat256	17,509	
D10Mgh18	18,23	
D10Rat46	19,81	
D10Mit16	20,01	
D10Rat45	20,23	•
D10Mit5	21,608	
D10Rat43	23,42	•
D10Rat44	24,7	•
D10Rat41	25,401	•
D10Mit10	27,18	
D10Rat71	29,54	
D10Rat40	29,64	
D10Mgh11	29,97	•

Abbildung 4.5: Schematische Darstellung des Chromosoms 10 der Ratte im Bereich der Marker *D10Mgh25* bis *D10Mgh11* (*Mss7*) mit den physikalischen Positionen der ausgewählten und in Bezug auf die Inzuchtstämme BDIV und BDIX als polymorph oder nicht polymorph charakterisierten Mikrosatellitenmarker (grün: polymorphe Allele für BDIV und BDIX, rot: nicht polymorph für BDIV und BDIX, schwarz: nicht auswertbare Marker).

Sämtliche ausgewählte und getestete Mikrosatellitenmarker sind in den Tabellen in den Abbildungen 4.4 und 4.5 aufgelistet. Die schematische Darstellung der Chromosomen veranschaulicht, dass es zusammenhängende Segmente gibt, in denen BDIV und BDIX Ratten identische Allele haben (z.B. *D6Rat70* bis *D6Rat153*, *D6Rat120* bis *D6Rat174* und *D10Mit6* bis *D10Mit16*), d. h. der BDIV und BDIX Stamm haben überwiegend identische DNA-Sequenzen in diesen Bereichen.

#### **4.3.2 Haplotypenanalyse**

Mit Hilfe der in den Abbildungen 4.4 und 4.5 mit einem schwarzen Punkt markierten polymorphen Mikrosatellitenmarker wurden die erkrankten F<sub>2</sub> Weibchen Nr. 143 und 198 (*Mss4*) sowie Nr. 39, 85, 88, 124 und 198 (*Mss7*) genotypisiert (Abbildungen 4.6 a und b).

Der Locus *Mss4* konnte über die Haplotypenanalyse dieser F<sub>2</sub> Tiere auf 20,25 Mb vom Marker *D6Rat218* bis *D6Ngb* und der Locus *Mss7* auf 12,21 Mb vom Marker *D10Rat51* bis *D10Rat43* eingengt werden.

#### **4.4 Verifizierung der *Mss* Loci und Verkleinerung der physikalischen Abschnitte durch die Züchtung kongener Rattenstämme**

##### **4.4.1 Etablierung der kongenen Rattenstämme BDIX.*Mss1*(BDIV), BDIX.*Mss2*(BDIV), BDIX.*Mss4*(BDIV), BDIX.*Mss5*(BDIV) und BDIX.*Mss7*(BDIV)**

Durch die Herstellung kongener Rattenstämme wird es möglich bei einem polygenen Erbgang die Wirkung eines einzelnen krankheitsassoziierten Locus auf das Merkmal abzuschätzen und durch weitere Rückkreuzungen den Genort feinzukartieren. Dafür wurden Tiere gezüchtet, die auf dem genetischen Hintergrund der tumorsuszeptiblen BDIX Ratte ein homozygotes Fragment der tumorresistenten BDIV Ratte tragen, das einem *Mss* Locus entspricht.



Mb	7,68	14,62	38	52,75	76,38	79,92	81,68	90,95	91,54	93,08	93,37	95,06	98,84	99,75	100,19	102,45	102,88	109,46	111,2	112,27	119,06	123,2	127,68	133,08
Marker	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6
TierNr.	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143	143
198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198

Abbildung 4.6 a: Einengung des Locus *Mss4* über eine Haplotypenanalyse. In Fortführung der in Abbildung 4.2 gezeigten Experimente wurden die erkrankten F<sub>2</sub> Weibchen Nr. 143 und 198 im Bereich der Marker *D6Mgh5* bis *D6Mit1* und *D6Mit1* bis *D6Ngb* mit weiteren polymorphen Mikrosatellitenmarkern genotypisiert.

Mb	5,09	6,38	7,81	8,7	9,76	10,38	11,21	13,08	19,1	20,23	23,42	24,7	25,4	29,97	30,31	36,25	36,65	41,35
Marker	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10
Tier Nr.	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39	39
85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85	85
88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88	88
124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124	124
198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198	198

Abbildung 4.6 b: Einengung des Locus *Mss7* über eine Haplotypenanalyse. Im Vergleich zur Abbildung 4.1 wurden die erkrankten F<sub>2</sub> Weibchen Nr. 39, 85, 88, 124 und 198 im Bereich der Marker *D10Mgh25* bis *D10Mgh12* und *D10Mgh12* bis *D10Mgh11* mit weiteren polymorphen Mikrosatellitenmarkern genotypisiert.



Bei der hier verwendeten sogenannten „Speed congenic“ Technik (Wakeland, Morel et al. 1997) wird die Anzahl der notwendigen Generationen durch Selektion der Zuchttiere, die für die Rückkreuzungen verwendet werden, vermindert. Die männlichen Tiere jeder Rückkreuzungsgeneration werden mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern erst auf den Erhalt des chromosomalen Segments aus der BDIV Ratte und dann in einem zweiten Schritt im Hinblick auf homozygote BDIX Allele in den übrigen Anteilen des Genoms getestet. Dann werden die Tiere mit dem höchsten Gehalt an homozygoten BDIX Allelen für die nächste Rückkreuzung mit BDIX Weibchen ausgewählt.

Schon vor Beginn der Arbeiten für meine Dissertation war bereits damit begonnen worden, für die bis dahin bekannten Suszeptibilitätsloci *Mss1* und *Mss2* kongene Rattenstämme herzustellen. Diese kongenen Stämme tragen das chromosomale Segment, das dem jeweiligen Locus *Mss1* bzw. *Mss2* entspricht, aus der BDIV Ratte auf dem genetischen Hintergrund der BDIX Ratte. Ausgehend von späteren Ergebnissen der genomweiten Assoziationsanalysen an segregierenden Kreuzungen beider Stämme wurden fünf weitere Genorte (*Mss3-7*) kartiert, die mit Suszeptibilität und Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten Tumorentstehung im peripheren Nervensystem assoziiert sind.

Mit der separaten Züchtung von BDIX.*Mss4*(BDIV), BDIX.*Mss5*(BDIV) und BDIX.*Mss7*(BDIV) konnte rasch begonnen werden, da sich bei den Linien BDIX.*Mss1*(BDIV) und BDIX.*Mss2*(BDIV) in der dritten Generation noch Tiere befanden, die für die Loci *Mss4*, *Mss5* und *Mss7* heterozygot waren.

Der Stammbaum 4.1 auf Seite 58 veranschaulicht den Aufbau der vier kongenen Linien für die Loci *Mss1*, *Mss2*, *Mss5* und *Mss7*.

In der zweiten Rückkreuzungsgeneration wurde der Bock Nr. 2 für die Züchtung ausgewählt, da er für das gesamte Chromosom 1 (*Mss2*: *D1Rat33*- *D1Rat123*) und für das gesamte Chromosom 10 (*Mss1*: *D10Mit3*- *D10Mgh16*) heterozygot war und für die getesteten Marker auf den Chromosomen 2, 7, 17 und 20 bereits homozygote BDIX Allele aufwies. Die Nachkommen der Verpaarung von Bock Nr. 2 mit einem BDIX Weibchen wurden für die beim Bock Nr. 2 noch heterozygoten Mikrosatellitenmarker genotypisiert. Von den insgesamt 47 Nachkommen des Bocks Nr. 2 (Nr. 32- 78) wurden die Böcke Nr. 58, 75 und 77 für die Weiterzucht ausgewählt, deren Genotypen in Abbildung 4.7 dargestellt sind.

Mb	53,93	160	185,6	252,39	257,62
Marker	D1	D1	D1	D1	D1
Tier Nr.	Rat21	Mit4	MT1Pa	Rat83	Mit8
58	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
75	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
77	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX	IX/IX

Mb	11,96	47,7	105,74	157,94
Marker	D3	D3	D3	D3
Tier Nr.	Mgh8	Wox9	Mgh11	Mgh2
58	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
75	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
77	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX

Mb	5,43
Marker	D4
Tier Nr.	Rat2
58	IX/IX
75	IX/IX
77	IX/IX

Mb	99,08	140,93	143,55	154,28
Marker	D5	D5	D5	D5
Tier Nr.	Wox3	Mgh20	Rat33	MCO1
58	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
75	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
77	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX

Mb	75,05	76,38	114,03	133,08
Marker	D6	D6	D6	D6
Tier Nr.	Mit3	Mgh5	Rat12	Mgh2
58	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IX/IX
75	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
77	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX

Mb	103,7	127,9
Marker	D8	D8
Tier Nr.	Mgh3	Rat71
58	IX/IX	IV/IX
75	IX/IX	IV/IX
77	IX/IX	IV/IX

Mb	3,81
Marker	D9
Tier Nr.	Rat45
58	na
75	na
77	na

Mb	5,82	6,17	65,39	84,3	87,29	na
Marker	D10	D10	D10	D10	D10	D10
Tier Nr.	Rat2	Rat96	Mgh14	NGFR	Rat19	GH
58	IV/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX
75	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IX/IX
77	IV/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Mb	85,08
Marker	D11
Tier Nr.	Rat43
58	IV/IX
75	IX/IX
77	IX/IX

Mb	na
Marker	D12
Tier Nr.	Rat17
58	IX/IX
75	IX/IX
77	IX/IX

Mb	9,26	63,31	88,15
Marker	D13	D13	D13
Tier Nr.	Mgh2	Mgh5	Rat191
58	IV/IX	IV/IX	IV/IX
75	IV/IX	IV/IX	IV/IX
77	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Mb	21,88	44,92	74,97
Marker	D14	D14	D14
Tier Nr.	CSNA	Mit4	Rat40
58	IV/IX	IX/IX	IX/IX
75	IX/IX	IX/IX	IX/IX
77	IX/IX	IV/IX	IX/IX

Mb	3,00	16,36	56,09
Marker	D15	D15	D15
Tier Nr.	Rat42	Mit2	Mgh2
58	IX/IX	IX/IX	IX/IX
75	IX/IX	IX/IX	IX/IX
77	IX/IX	IX/IX	IX/IX

Mb	na	17,57
Marker	D16	D16
Tier Nr.	Mit5	Mgh2
58	IX/IX	IX/IX
75	IV/IX	IX/IX
77	IX/IX	IX/IX

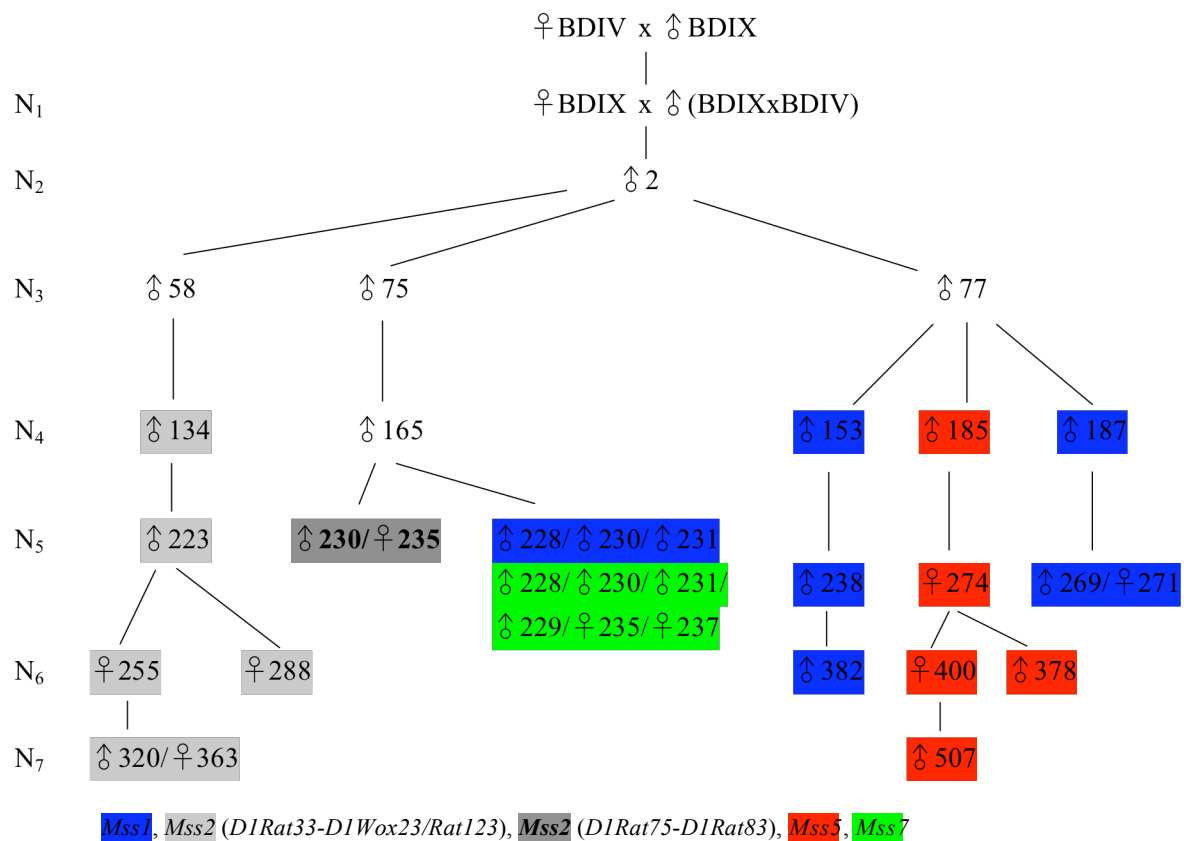
Mb	12,43	48,46	80,44
Marker	D18	D18	D18
Tier Nr.	Mit1	Mgh3	Mit9
58	IX/IX	IX/IX	IX/IX
75	IV/IX	IX/IX	IX/IX
77	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Mb	12,76	41,61
Marker	D19	D19
Tier Nr.	Mit2	Mit6
58	IV/IX	IX/IX
75	IX/IX	IX/IX
77	na	IX/IX

Mb	23,54	45,56
Marker	DX	DX
Tier Nr.	Rat4	Rat40
58	IX/IX	IX/IX
75	IX/IX	IX/IX
77	IX/IX	IX/IX

Abbildung 4.7: „Genome scan“ der Böcke Nr. 58, 75 und 77. Getestet wurden Mikrosatellitenmarkern mit relativ großen Abständen (ca. 20- 30 Mb) auf den Chromosomen 1, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 18, 19 und dem X-Chromosom. Die Chromosomen 2, 7, 17 und 20 hatten bereits beim Bock Nr. 2 homozygote BDIX Allele.



Stammbaum 4.1: Zucht der kongenen Linien BDIX.Mss1(BDIV), BDIX.Mss2(BDIV), BDIX.Mss5(BDIV) und BDIX.Mss7(BDIV).

Für den Aufbau der kongenen Linien *Mss1*, *Mss2* und *Mss7* wurde der Bock Nr. 75 mit einem BDIX Weibchen verpaart. Der Bock Nr. 77 diente zum Aufbau der Linien *Mss1*, *Mss5* und *Mss7*, der Bock Nr. 58 zum Aufbau der Linie *Mss2*.

Soweit es die zur Verfügung stehenden Tiere ermöglichten, wurden für ein kongenes Fragment verschiedene, aus unabhängigen „Foundern“ hervorgehende kongene Linien parallel aufgebaut. Diese Vorgehensweise verhindert, dass spontane Mutationen durch Bruder-Schwester-Verpaarungen fixiert werden (Bildung von Sublinien).

#### 4.4.1.1 *Mss1*

In der vierten Rückkreuzungsgeneration wurden die Böcke Nr. 153, 165 und 187 zur weiteren Verpaarung mit BDIX Weibchen für den Aufbau der kongenen Linie für, den auf Chromosom 10 gelegenen, Locus *Mss1* ausgewählt, da sie in der Kernregion der Assoziation um den Marker *D10Wox23* (84,7 Mb) die Allelkombination IV/IX besaßen. Zur Feststellung des genetischen Hintergrundes wurden die Mikrosatellitenmarker, die bei den Vätern Bock

Nr. 75 und 77 noch heterozygot waren, genotypisiert. Die Genotypen der Nachkommen an diesen Mikrosatellitenmarkern gehen aus den Abbildungen 4.8 a und b hervor.

Mb	160	185,6	252,39	257,62
Marker	<i>D1</i>	<i>D1</i>	<i>D1</i>	<i>D1</i>
TierNr.	<i>Mit4</i>	<i>MT1Pa</i>	<i>Rat83</i>	<i>Mit8</i>
149	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX
165	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX

Mb	0,01	99,08	140,93	143,6
Marker	<i>D5</i>	<i>D5</i>	<i>D5</i>	<i>D5</i>
TierNr.	<i>Mgh1</i>	<i>Wox3</i>	<i>Mgh20</i>	<i>Rat33</i>
149	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX
165	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX

Mb	7,68	38,0	52,75	98,84	111,2	133,08	138,23
Marker	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>	<i>D6</i>
TierNr.	<i>Wox 10</i>	<i>Rat33</i>	<i>Rat132</i>	<i>Mit1</i>	<i>Ngb</i>	<i>Mgh2</i>	<i>Mgh4</i>
149	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
165	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX

Mb	127,9
Marker	<i>D8</i>
TierNr.	<i>Rat71</i>
149	IX/ IX
165	IX/ IX

Mb	6,17	65,39	84,3	87,29
Marker	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>
TierNr.	<i>Rat96</i>	<i>Mgh14</i>	<i>NGFR</i>	<i>Rat19</i>
149	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
165	IV/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX

Mb	9,26	63,31	88,15
Marker	<i>D13</i>	<i>D13</i>	<i>D13</i>
TierNr.	<i>Mgh2</i>	<i>Mgh5</i>	<i>Rat191</i>
149	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
165	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX

Mb	na
Marker	<i>D16</i>
TierNr.	<i>Mit5</i>
149	IV/ IX
165	IX/ IX

Mb	12,43
Marker	<i>D18</i>
TierNr.	<i>Mit1</i>
149	IX/ IX
165	IX/ IX

Abbildung 4.8 a: „Genome scan“ der Nachkommen von Bock 75.  
Getestet wurden Mikrosatellitenmarker auf den Chromosomen 1, 5, 6, 8, 10, 13, 16, und 18 der Böcke Nr. 149 und 165. Bei den übrigen Chromosomen waren die getesteten Marker bereits beim Bock Nr. 75 homozygot für BDIX Allele.

Mb	160	185,6
Marker	<i>D1</i>	<i>D1</i>
TierNr.	<i>Mit4</i>	<i>MT1Pa</i>
153	IX/ IX	IX/ IX
185	IV/ IX	IV/ IX
187	IV/ IX	IV/ IX

Mb	11,96
Marker	<i>D3</i>
TierNr.	<i>Mgh8</i>
153	IV/ IX
185	IV/ IX
187	IX/ IX

Mb	127,92
Marker	<i>D8</i>
TierNr.	<i>Rat71</i>
153	IX/ IX
185	IX/ IX
187	IX/ IX

Mb	5,82	6,17	50,6	84,3	86,33	na
Marker	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>	<i>D10</i>
TierNr.	<i>Rat2</i>	<i>Rat96</i>	<i>Rat244</i>	<i>NGFR</i>	<i>Mgh5</i>	<i>GH</i>
153	IV/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
185	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX
187	IV/ IX	IX/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX

Mb	9,26	63,31	88,15
Marker	<i>D13</i>	<i>D13</i>	<i>D13</i>
TierNr.	<i>Mgh2</i>	<i>Mgh5</i>	<i>Rat191</i>
153	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX
185	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX
187	IV/ IX	IV/ IX	IV/ IX

Mb	21,88	44,92
Marker	<i>D14</i>	<i>D14</i>
TierNr.	<i>CSNA</i>	<i>Mit4</i>
153	IX/ IX	IV/ IX
185	IX/ IX	IV/ IX
187	IX/ IX	IX/ IX

Mb	12,43	48,46	80,44
Marker	<i>D18</i>	<i>D18</i>	<i>D18</i>
TierNr.	<i>Mit1</i>	<i>Mgh3</i>	<i>Mit9</i>
153	IX/ IX	IX/ IX	IV/ IX
185	IX/ IX	IX/ IX	IX/ IX
187	IV/ IX	IV/ IX	IX/ IX

Mb	12,76
Marker	<i>D19</i>
TierNr.	<i>Mit2</i>
153	IX/ IX
185	IX/ IX
187	IX/ IX

Abbildung 4.8 b: „Genome scan“ der Nachkommen von Bock 77.  
Getestet wurden Mikrosatellitenmarker auf den Chromosomen 1, 3, 8, 10, 13, 14, 18 und 19 der Böcke Nr. 153, 185 und 187. Bei den übrigen Chromosomen waren die getesteten Marker bereits beim Bock Nr. 77 homozygot für BDIX Allele.

Der genetische Hintergrund der Nachkommen der Böcke Nr. 153 (Bock Nr. 238), Nr. 165 (Bock Nr. 228, 230 und 231) und Nr. 187 (Bock Nr. 269 und Weibchen Nr. 271) wurde nicht bestimmt. Diese Nachkommen wurden auf das kongene Fragment hin selektioniert und mit BDIX Tieren rückgekreuzt. Ebenso wurde mit den Nachkommen von Bock Nr. 238 (Bock Nr. 382) verfahren.

#### 4.4.1.2 *Mss2*

Die statistische Auswertung der Kopplungsanalysen an den (BDIX x BDIV) F<sub>2</sub> Tieren zur Bestimmung der genomischen Regionen, die mit der Suszeptibilität bzw. Resistenz gegenüber der Tumorentstehung im PNS assoziiert sind, war zum Zeitpunkt der dritten bzw. vierten Rückkreuzungsgeneration noch nicht ganz abgeschlossen. Es zeigte sich, dass die Kernregion der Assoziation des Locus *Mss2* nicht, wie ursprünglich ermittelt, beim Mikrosatellitenmarker *DIMgh12* (247,43 Mb), sondern beim Marker *DIMit4* (160 Mb) bzw. *DIMTIPa* (185,6 Mb) liegt.

Für die kongene Linie *Mss2* wurden daher zwei Sublinien gezüchtet. Der Bock Nr. 134 wurde aufgrund seines heterozygoten Fragments am Locus *Mss2*, das vom Marker *DIRat33* (116,23 Mb) bis *DIRat123* (223,89 Mb) reicht, ausgewählt und mit einem BDIX Weibchen rückgekreuzt. Die übrigen Chromosomen wurden bei diesem Tier nicht genotypisiert. Ebenso wurde bei den Nachkommen von Bock Nr. 134 in der fünften, sechsten und siebten Rückkreuzungsgeneration verfahren.

Die Genotypisierung des Bocks Nr. 165 (Abbildung 4.8 a) zeigte, dass dieser für Chromosom 1 für die Marker *DIRat83* (252,39 Mb) und *DIMit8* (257,62 Mb) die Allelkombination IV/IX besaß. Seine Nachkommen Bock Nr. 230 und Weibchen Nr. 235 waren im Bereich der Marker *DIRat75* (235,26 Mb) bis *DIRat83* (252,39 Mb) heterozygot (Abbildung 4.9). Für die übrigen getesteten Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 1 trugen sie homozygote BDIX Allele. Sie wurden zum Aufbau der kongenen Linie BDIX.BDIV-*DIRat75*/*DIRat83* mit BDIX Tieren verpaart.

Mb	116,23	160	185,6	212,23	223,89	235,26	252,39
Marker	<i>DI</i>	<i>DI</i>	<i>DI</i>	<i>DI</i>	<i>DI</i>	<i>DI</i>	<i>DI</i>
Tier Nr.	<i>Rat33</i>	<i>Mit4</i>	<i>MTIPa</i>	<i>Wox23</i>	<i>Rat123</i>	<i>Rat75</i>	<i>Rat83</i>
230	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX
235	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX

Abbildung 4.9: Genotypen der Tiere Nr. 230 und 235 im Bereich der Marker *DIRat33* bis *DIRat83* auf Chromosom 1.

#### 4.4.1.3 *Mss5*

Die Kernregion der Assoziation des Locus *Mss5* liegt beim Mikrosatellitenmarker *D13Rat191* (88,15 Mb).

Ursprünglich wurde der Bock Nr. 77 mit einem BDIX Weibchen zum Aufbau der kongenen Linie für *Mss1* auf Chromosom 10 rückgekreuzt. Der relativ grobe „Genome scan“ in der dritten Rückkreuzungsgeneration zeigte, dass Bock Nr. 77 zudem für alle auf Chromosom 13 getesteten Marker IV/IX Allele aufwies (Abbildung 4.7). Sein Nachkomme (Bock Nr. 185) war für die Marker *D13Mgh2* (9,26 Mb), *D13Rat25* (46,53 Mb), *D13Rat26* (56,84 Mb), *D13Mgh5* (63,31 Mb), *D13Mit5* (78,08 Mb) und *D13Rat191* (88,15 Mb) heterozygot. Der Bock Nr. 185 wurde daher zum Aufbau der kongenen Linie *Mss5* mit einem BDIX Weibchen gekreuzt. Das aus dieser Kreuzung hervorgegangenen Weibchen Nr. 274 war für die getesteten Marker *D13Mgh2* (9,26 Mb), *D13Mit5* (78,08 Mb) und *D13Rat191* (88,15 Mb) heterozygot. Es wurde ohne weitere Genotypisierung der auf Chromosom 1, 3, 10 und 14 beim Bock Nr. 185 heterozygot verbliebenen Marker (Abbildung 4.8 b) sofort mit einem BDIX Bock rückgekreuzt. Die Nachkommen (Bock Nr. 378 und Weibchen Nr. 400), die für alle getesteten Marker auf Chromosom 13 heterozygot waren (Abbildung 4.10), wurden wiederum sofort mit BDIX Tieren gekreuzt. Ebenso wurde beim Bock Nr. 507 verfahren.

Mb	9,26	46,53	56,84	63,31	78,08	88,15
Marker	<i>D13</i>	<i>D13</i>	<i>D13</i>	<i>D13</i>	<i>D13</i>	<i>D13</i>
Tier Nr.	<i>Mgh2</i>	<i>Rat25</i>	<i>Rat26</i>	<i>Mgh5</i>	<i>Mit5</i>	<i>Rat191</i>
378	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
400	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Abbildung 4.10: Genotypen der Tiere Nr. 378 und 400 im Bereich der Marker *D13Mgh2* bis *D13Rat191* auf Chromosom 13.

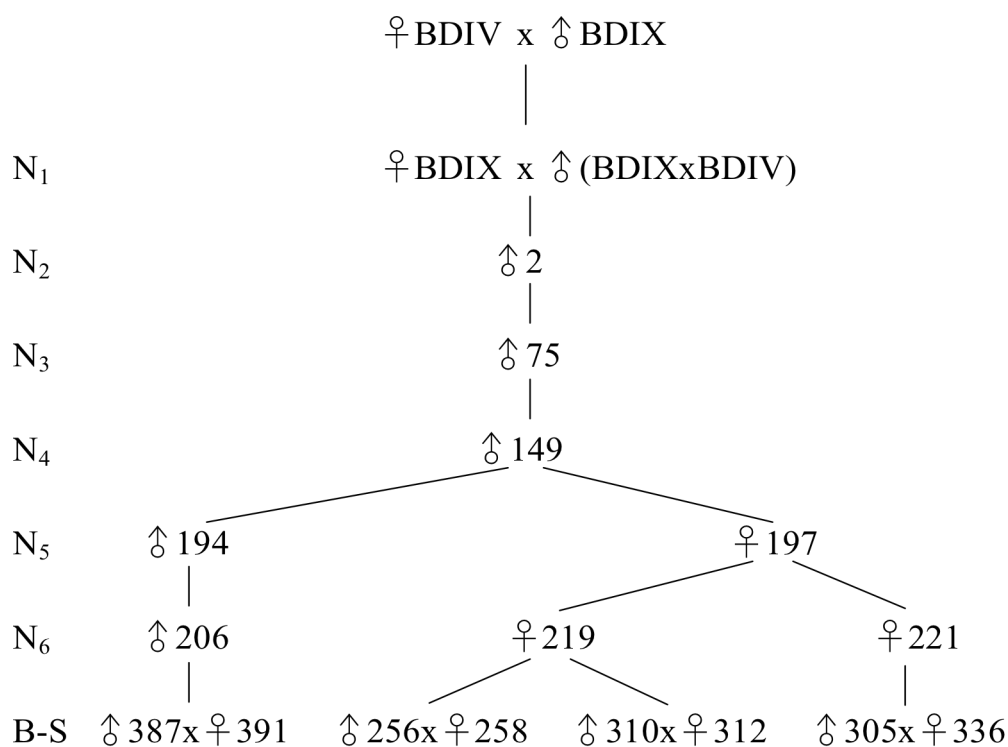
#### 4.4.1.4 *Mss7*

Als sich die Züchtung der kongenen Stämme in der vierten Rückkreuzungsgeneration befand, konnte auf Chromosom 10 neben dem Locus *Mss1* ein zusätzlicher Locus (*Mss7*) kartiert werden. Bei den Nachkommen (Nr. 228, 229, 230, 231, 235 und 237) des ursprünglich für *Mss1* auf Chromosom 10 selektierten Bocks Nr. 165 blieb auch die Region um den Mikrosatellitenmarker *D10Mgh12* (*Mss7*) heterozygot erhalten (Abbildung 4.11). Diese Tiere wurden daher mit BDIX Tieren verpaart um die kongene Linie *Mss7* zu etablieren. Dabei tragen die Tiere Nr. 228, 230, 231 und 235 auch im Bereich des Locus *Mss1* heterozygote Allele.

#### 4.4.1.5 *Mss4*

Der Aufbau der kongenen Linie für den Locus *Mss4* wird im Stammbaum 4.2 dargestellt. Vom Bock Nr. 149, der ein Nachkomme von Bock Nr. 75 ist, stammen alle weiteren Sublinien ab. Der „Genome scan“ in der N4 Generation ergab, dass der Bock Nr. 149 auf Chromosom 6 für den Locus *Mss4* (*D6Mit1*) und für vier weitere Mikrosatellitenmarker auf den Chromosomen 1, 5 und 16 die Allelkombination IV/IX hat (Abbildung 4.8 a). Die Nachkommen Nr. 194 und Nr. 197 von Bock Nr. 149 und einem BDIX Weibchen wurden bezüglich ihres kongenen Fragments ausgewählt (Abbildung 4.12).

Der genetische Hintergrund des Bocks Nr. 194 und des Weibchens Nr. 197 wurden nicht bestimmt. Sie wurden sofort mit BDIX Tieren rückgekreuzt. In der N6 Generation wurden die Tiere Nr. 206, 219 und 221, die unterschiedliche Fragmente auf Chromosom 6 mit der Allelkombination IV/IX besitzen (Abbildung 4.13), ausgewählt und einem engmaschigen „Whole genome scan“ unterzogen. Das kongene Fragment „c“ des Bocks Nr. 206 reicht vom Marker *D6Rat132* bis *D6(14)Mgh4*. Das kongene Fragment „a“ des Weibchens Nr. 219 reicht vom Marker *D6Mit1* bis *D6Mgh3* und das kongene Fragment „b“ des Weibchens Nr. 221 vom Marker *D6Rat132* bis *D6CPG1a* (Abbildung 4.14).



Stammbaum 4.2: Aufbau der kongenen Linie BDIX.(*Mss4*)BDIV.



Mb	5,09	6,38	8,7	13,08	19,1	20,23	23,42	24,7	29,97	30,31	36,65	41,35	50,6	65,0	65,39	70,204	71,08	84,3	86,33	89,29	89,43	92,79	105,9	107,27
Marker	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10	D10
TierNr.	Mgh25	Rat95	Gat1	GFER	Mgh12	Rat45	Rat43	Rat44	Mgh11	Rat39	Mit4	Mit3	Rat244	Mgh6	Mgh14	Rat98	Rat58	NGFR	Mgh5	Rat99	Wox19	Mgh21	Rat7	Mgh16
228	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
229	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
230	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
231	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
235	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
237	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Abbildung 4.11: Genotypen der Nachkommen von Bock Nr. 165 für Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 10. Die Tiere Nr. 228, 230, 231 und 235 tragen sowohl in der Kernregion der Assoziation für den Locus *Mss7* [*D10Mgh12* (19,1 Mb)] als auch am Locus *Mss1* [*D10Wox23* (84,7 Mb)] die Allelkombination IV/IX.

Mb	52,75	76,38	81,68	93,37	98,84	99,75	100,19	102,45	111,2	112,27	123,2	127,68	134,09
Marker	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6
TierNr.	Rat132	Mgh5	Rat19	Rat18	Mit1	Rat229	Rat88	Wox4	Ngb	Rat66	CPG1a	Mgh3	Rat110
194	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	na	IV/IX	na	IV/IX
197	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Abbildung 4.12: Genotypen der Tiere Nr. 194 und 197 für Mikrosatelliten auf Chromosom 6. Der Bock Nr. 194 ist für alle Marker von *D6Rat132* bis *D6Rat110* heterozygot (IV/IX). Das Weibchen Nr. 197 unterscheidet sich genetisch vom Bock Nr. 194 durch homozygote BDIV Allele am Marker *D6Rat110*.

Mb	7,68	14,62	38,0	52,75	76,38	79,92	81,68	90,95	93,37	95,06	98,84	99,75	100,19	102,45	111,2	112,27	119,06	123,2	127,68	133,08	134,09	138,3
Marker	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6	D6
TierNr.	Wox10	Rat47	Rat33	Rat132	Mgh5	Rat98	Rat19	Rat218	Rat18	Rat17	Mit1	Rat229	Rat88	Wox4	Ngb	Rat66	Rat114	CPG1a	Mgh3	Mgh2	Rat110	Mgh4
206	na	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX
219	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IX/IX
221	IX/IX	IX/IX	IX/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX	IV/IX

Abbildung 4.13: Genotypen der Tiere Nr. 206, 219 und 221 für Mikrosatellitenmarker am *Mss4* Locus auf Chromosom 6. Der Bock Nr. 206 besitzt im Bereich der Marker *D6Rat132* bis *D6Mgh4* heterozygote IV/IX Allele. Das Weibchen Nr. 219 hat die Allelkombination IV/IX



Nach dem „Whole genome scan“ (s. u.) wurden die Ratten Nr. 206, 219 und 221 nochmals mit BDIX Tieren rückgekreuzt. Die Nachkommen der Ratte Nr. 219, die das jeweilige kongene Fragment heterozygot besaßen, wurden untereinander verpaart um das BDIV Fragment homozygot BDIV zu fixieren (siehe Seite 67).

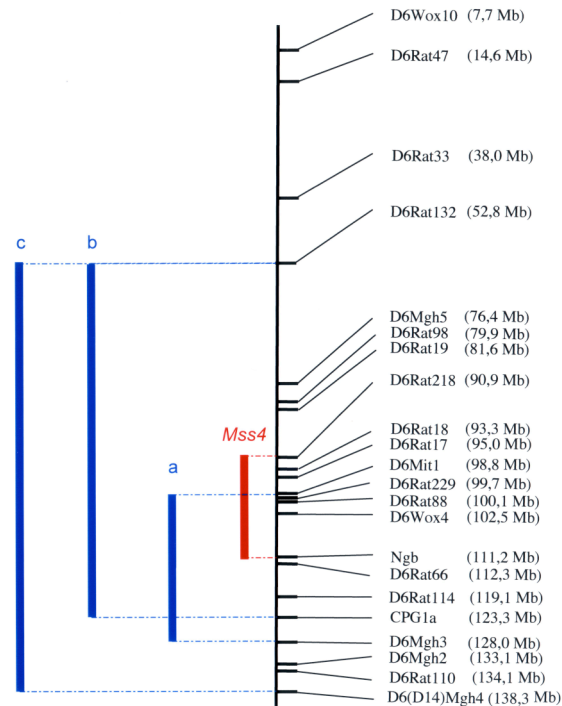


Abbildung 4.14: Physikalische Lage der kongenen Fragmente der Linien BDIX.Mss4a(BDIV), BDIX.Mss4b(BDIV) und BDIX.Mss4c(BDIV).

#### 4.4.2 „Whole genome scan“ der kongenen BDIX.Mss4(BDIV) Ratten

Für die weiteren Untersuchungen, die an den kongenen Tieren durchgeführt werden sollten, war es wichtig, dass der genetische Hintergrund der kongenen BDIX.Mss4(BDIV) Ratten keine Kontaminationen des BDIV Genoms mehr aufweist. Daher war es sinnvoll, vor der Generierung von homozygoten kongenen Trägern durch Bruder-Schwester-Verpaarung, eine genomweite Genotypisierung mit enger beieinanderliegenden Markern durchzuführen.

#### 4.4.2.1 Mikrosatelliten für den „Whole genome scan“

Mit dem Ziel, das Genom der kongenen BDIX.*Mss4*(BDIV) Ratten in Abständen von ca. 10 Mb mit polymorphen (in bezug auf BDIV und BDIX Allele) Mikrosatelliten zu screenen, wurden die bereits in der Arbeitsgruppe Kindler-Röhrborn getesteten Mikrosatelliten verwendet und zusätzlich in der Datenbanken „Rat Genome V3.1 at RGD“ des „Baylor College of Medicine (HGSC)“ Projekts nach weiteren Markern gesucht.

Dabei stellte sich heraus, dass das Genom der BDIV und BDIX Ratte in einigen Bereichen sehr ähnlich zu sein scheint, d. h. dass dort keine polymorphen Mikrosatelliten aufzufinden sind.

Beispielsweise waren von 46 getesteten Mikrosatelliten im Bereich von 24,71 Mb bis 64,15 Mb auf Chromosom 7 in Bezug auf die Rattenstämme BDIV und BDIX 41 Mikrosatelliten nicht polymorph. Ebenso zeigten von 32 Mikrosatelliten, die im Bereich von 0 bis ca. 75 Mb des Rattenchromosoms 6 analysiert wurden, nur vier Längenpolymorphismen. Weiterhin konnte auf Chromosom 6 im Bereich von 102,88 Mb bis 109,46 Mb, obwohl 23 Marker getestet wurden, kein Mikrosatelliten-Polymorphismus entdeckt werden.

Im Anhang 1 ist die Verteilung von polymorphen bzw. nicht polymorphen (bezogen auf die Stämme BDIV und BDIX) Mikrosatelliten im Genom der BD Ratte dargestellt.

#### 4.4.2.2 Genotypisierung der Ratten Nr. 206, 219 und 221

Im Anhang 2 sind die für den „Whole genome scan“ verwendeten polymorphen Mikrosatelliten mit ihrer Position auf dem Chromosom aufgelistet. Die Ratten Nr. 206, 219 und 221 trugen an allen dort aufgeführten Mikrosatelliten homozygote BDIX Allele, mit Ausnahme des Markers *D5Wox13*, für den sowohl das Tier Nr. 206 als auch das Tier Nr. 219 die Allelkombination IV/IX trugen (Abbildung 4.15 a). Der Bereich um *D5Wox13* (78,4Mb) wurde daher noch genauer genotypisiert. Für die umliegenden polymorphen Mikrosatellitenmarker *D5Rat12* (70,67 Mb), *D5Rat84* (71,97 Mb), *D5Rat104* (72,36 Mb) und *D5Rat16* (79,86Mb) trugen die Tiere Nr. 206 und 219 homozygote IX/IX Allele (Abbildung 4.15 b).

Da der Bereich, der sowohl beim Tier Nr. 206 als auch beim Tier Nr. 219 heterozygot vorliegt, auf den Marker *D5Wox13* beschränkt ist, und eine Doppelrekombination in einem so kurzen Segment relativ unwahrscheinlich erscheint, ist es durchaus denkbar, dass an einem der beiden Allele des Markers *D5Wox13* eine spontane Mutation aufgetreten ist, die der Bock Nr. 149 an seine Nachkommen Nr. 206 und 219 vererbt hat.

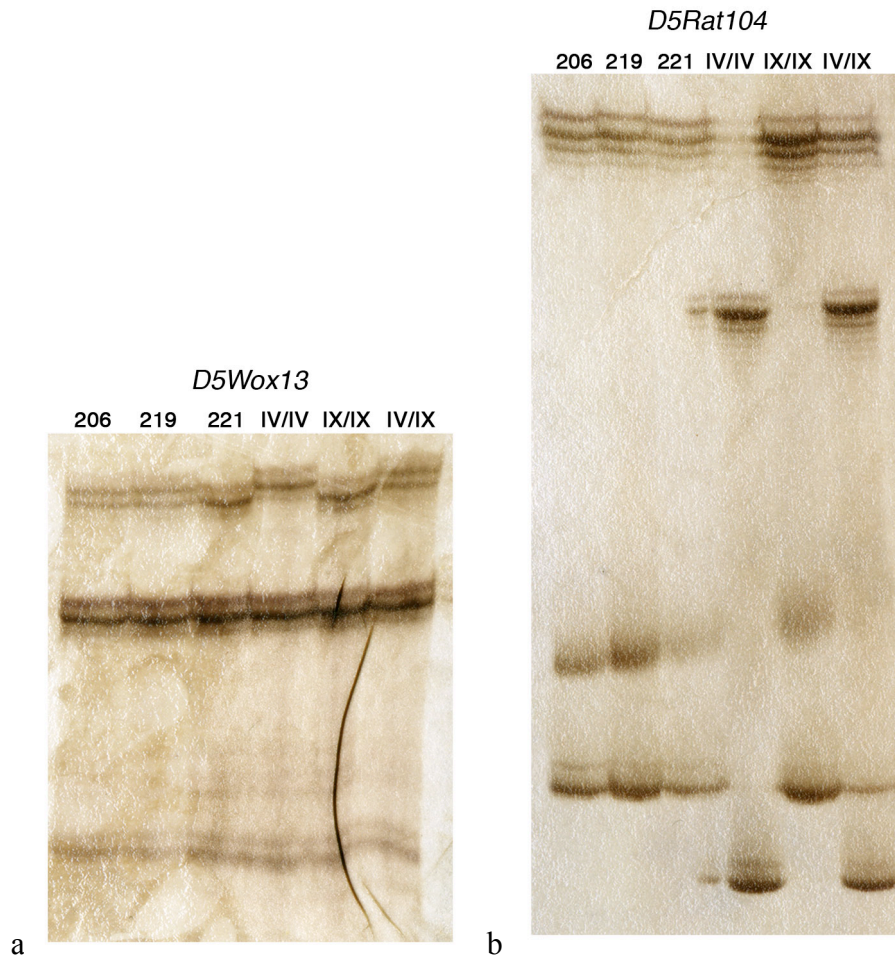
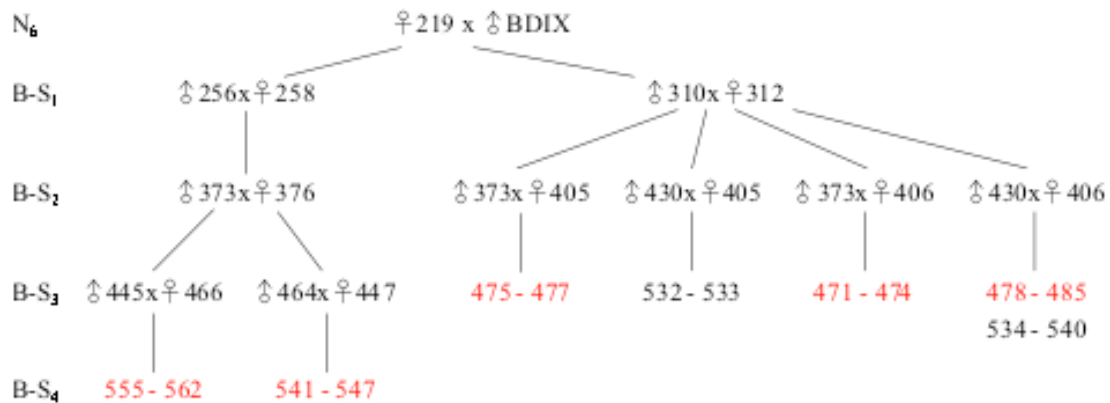


Abbildung 4.15 a und b: Gelelektrophorese der durch PCR amplifizierten Mikrosatelliten-Marker *D5Wox13* und *D5Rat104* (Silberfärbung).

#### 4.4.3 Induktion von MPNSTs in kongenen BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten und Effekte des kongenen Fragments *Mss4a* auf die Tumorzinzidenz und die Überlebenszeit der Tiere

28 Ratten der zweiten bis vierten Bruder-Schwester-Verpaarung wurden am ersten Postnataltag mit EtNU behandelt (Stammbaum 4.3). 15 dieser Tiere waren homozygot kongene BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten (Nr. 475, 476, 478- 485 und 541- 545). Bei den 13 weiteren Ratten war das *Mss4a* Fragment nicht vollständig homozygot: Die Tiere Nr. 471- 474, 477, 557, 560 und 561 hatten im Bereich der Marker *D6Mit1* bis *D6CPG1a* homozygote BDIV Allele für die getesteten Mikrosatellitenmarker; das homozygot kongene Fragment der Nachkommen Nr. 555, 556, 558, 559 und 562 reichte vom Marker *D6Mit1* bis *D6Ngh*. Die kongenen BDIX.*Mss4a*(BDIV) Tiere Nr. 532- 540 dienten als Kontrolltiere.



Stammbaum 4.3: Züchtung homozygoter BDIX.(*Mss4*)BDIV Ratten. Tiere, die mit EtNU behandelt wurden, sind rot, Tiere ohne EtNU-Behandlung schwarz dargestellt

Der Locus *Mss4* konnte über Haplotypenanalyse auf den Bereich vom Mikrosatellitenmarker *D6Rat218* (90,9 Mb) bis *D6Ngb* (111,2 Mb) eingeengt werden (siehe 4.3.2). Aus diesem Grund konnten die oben erwähnten, ab dem Mikrosatellitenmarker *D6Cpg1a* (123,2 Mb) bzw. *D6Mgh3* (128,0 Mb) heterozygoten Ratten in gleicher Weise wie die Tiere mit vollständig homozygoten *Mss4a* Fragment herangezogen werden, um die Effekte des *Mss4a* Fragments auf die Tumorzinzidenz und die Überlebenszeit der Tiere nach EtNU-Exposition zu untersuchen.

Die Abbildungen 4.16 a und b zeigen die Länge des homozygoten kongenen *Mss4a* Fragments, das vom Mikrosatellitenmarker *D6Mit1* bis *D6Mgh3* reicht. Der Abbildung 4.16 b kann darüber hinaus der Genotyp der einzelnen Ratten an den verschiedenen Markern im Bereich des Locus *Mss4a* sowie die Inzidenz von MPNSTs und die Überlebenszeit der Tiere entnommen werden.

Von 12 männlichen und 16 weiblichen kongenen Tieren, die mit EtNU behandelt worden waren, entwickelten sieben männliche und vier weibliche Tiere ein MPNST des *Nervus trigeminus*. Fünf männliche und neun weibliche kongene Tieren erkrankten an anderen Tumoren. Keines der Kontrolltiere erkrankte an einem MPNST des *Nervus trigeminus* oder an einem anderen Tumor.

Chromosom 6

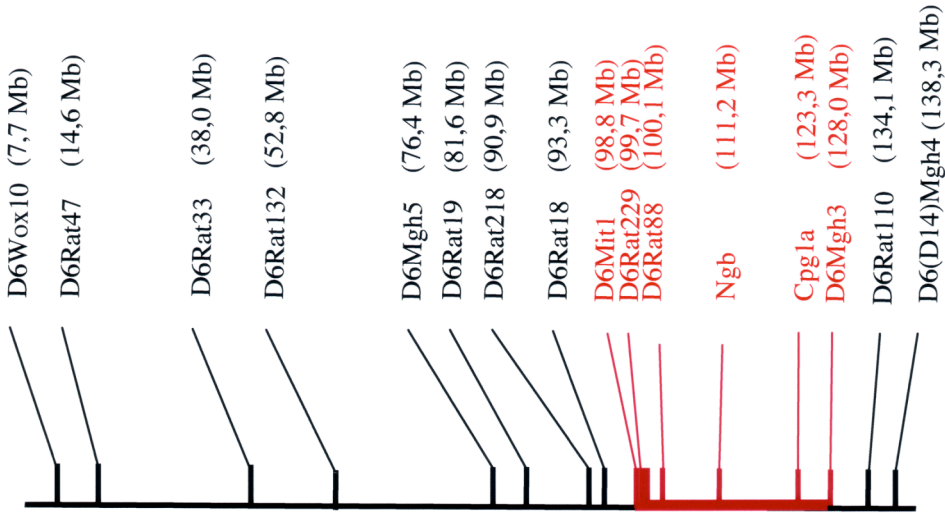


Abbildung 4.16 a: Physikalische Lage des kongenen Fragments *Mss4a* auf dem Chromosom 6.

Mb	98,84	99,75	100,19	111,2	123,2	127,68			
Marker	D6	D6	D6	D6	D6	D6			
Tier Nr.	Mitl	Rat229	Rat88	NgB	Cpg1a	Mgh3	Geschlecht	Lebensdauer	MPNST des N. trig.
532	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	f	> 320 Tage	Kontrollier
533	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	f	> 320 Tage	Kontrollier
534	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	m	> 276 Tage	Kontrollier
535	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	m	> 276 Tage	Kontrollier
536	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	m	> 276 Tage	Kontrollier
537	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	f	> 276 Tage	Kontrollier
538	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	f	> 276 Tage	Kontrollier
539	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	f	> 276 Tage	Kontrollier
540	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	f	> 276 Tage	Kontrollier
478	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	m	158 Tage	kein MPNST
479	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	m	183 Tage	MPNST des N. trig.
480	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	f	278 Tage	kein MPNST
481	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	f	165 Tage	kein MPNST
482	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	f	202 Tage	kein MPNST
483	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	f	193 Tage	MPNST des N. trig.
484	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	f	265 Tage	kein MPNST
485	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	f	229 Tage	MPNST des N. trig.
541	na	na	na	IV/IV	IV/IV	na	m	221 Tage	kein MPNST
542	na	na	na	na	na	na	m	172 Tage	MPNST des N. trig.
543	IV/IV	na	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	m	198 Tage	kein MPNST
544	IV/IV	na	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	m	186 Tage	MPNST des N. trig.
545	IV/IV	na	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	f	> 275 Tage	
475	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	m	124 Tage	MPNST des N. trig.
476	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	m	234 Tage	MPNST des N. trig.
477	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IX	f	165 Tage	kein MPNST
471	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IX	m	120 Tage	MPNST des N. trig.
472	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IX	f	210 Tage	na
473	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IX	f	304 Tage	kein MPNST
474	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	na	IV/IX	f	285 Tage	MPNST des N. trig.
555	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	IV/IX	IV/IX	m	207 Tage	MPNST des N. trig.
556	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	IV/IX	IV/IX	m	123 Tage	kein MPNST
557	IV/IV	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	na	m	221 Tage	kein MPNST
558	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	IV/IX	IV/IX	f	220 Tage	kein MPNST
559	IV/IV	na	IV/IV	IV/IV	IV/IX	IX/IX	f	> 275 Tage	
560	na	na	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IX	f	207 Tage	MPNST des N. trig.
561	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IX	f	123 Tage	kein MPNST
562	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IV	IV/IX	IV/IX	f	137 Tage	kein MPNST

Abbildung 4.16 b: Genotypen der kongenen BDIX.*Mss4a*(BDIV) Ratten für Mikrosatellitenmarker auf Chromosom 6; Inzidenz von MPNSTs des *Nervus trigeminus* nach EtNU-Exposition und Überlebenszeit in Tagen. Unterschiedliche Würfe sind durch dicke Querbalken getrennt (vgl. Stammbaum 4.3).

In Abbildung 4.17 sind die Kaplan-Meier-Überlebenskurven der kongenen *Mss4a* Tiere im Vergleich zu BDIX Tieren jeweils geschlechtsspezifisch dargestellt. Die mediane Überlebenszeit der an einem MPNST erkrankten kongenen Weibchen ist mit 285 Tagen deutlich länger als bei erkrankten kongenen Männchen (207 Tage). Darüber hinaus zeigte sich ein deutlicher Unterschied zwischen der MPNST-Inzidenz und Überlebenszeit kongener *Mss4a* Weibchen im Vergleich zu BDIX Weibchen (mediane Überlebenszeit 214 Tage), während sich die Kurven für kongene Männchen und männliche Ratten des BDIX Inzuchtstammes (mediane Überlebenszeit 201 Tage) nicht unterscheiden.

Während das *Mss4a* Fragment in weiblichen kongenen Ratten einen deutlichen tumorpräventiven Effekt auf die Entstehung von MPNSTs des *Nervus trigeminus* gegenüber dem Ausgangsstamm BDIX ausübt, entspricht das MPNST-Risiko männlicher kongener *Mss4a* Ratten jenem des Ausgangsstammes.

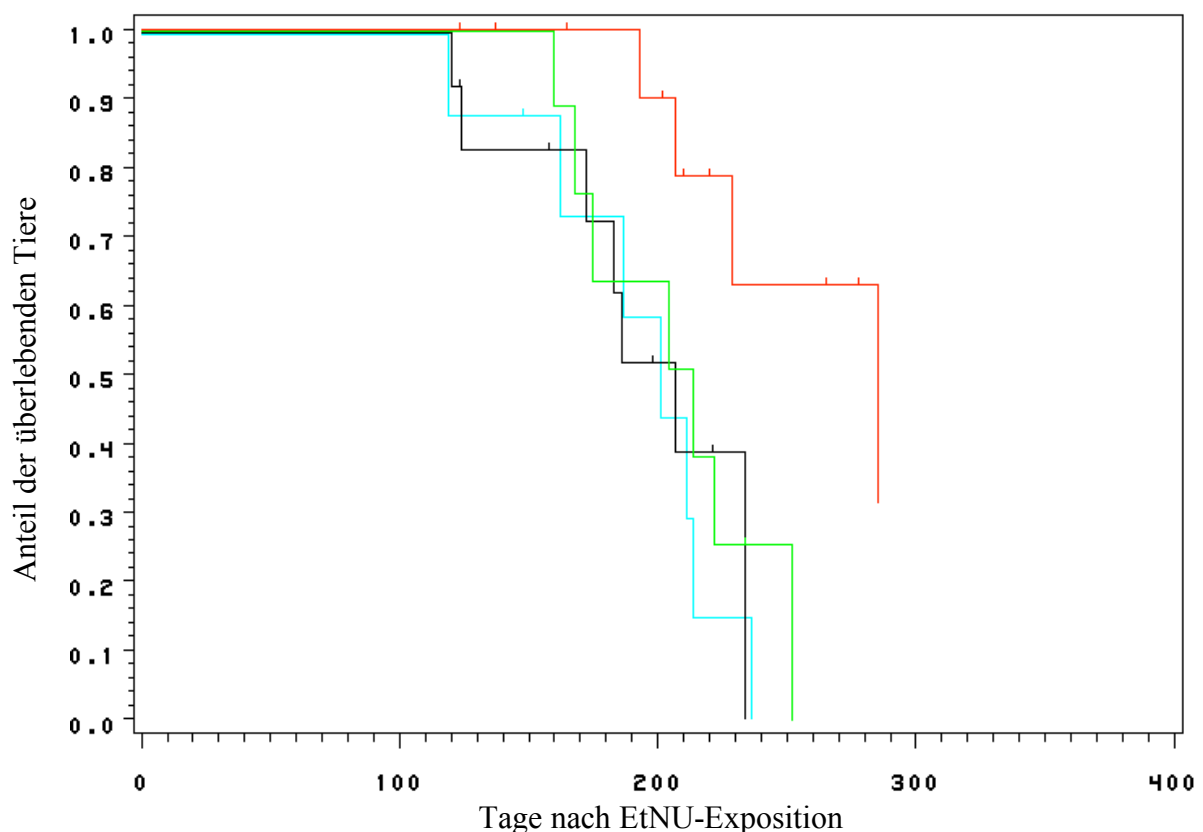


Abbildung 4.17: Kaplan-Meier-Überlebenskurven

— BDIX.Mss4a(BDIV) Weibchen	mediane Überlebenszeit: 285 Tage
— BDIX.Mss4a(BDIV) Männchen	mediane Überlebenszeit: 207 Tage
— BDIX Weibchen	mediane Überlebenszeit: 214 Tage
— BDIX Männchen	mediane Überlebenszeit: 201 Tage

## 4.5 Analyse von Kandidatengenen für verschiedene Regionen

In der vorliegenden Arbeit wurden Kandidatengene im Hinblick auf Sequenz- bzw. Expressionsunterschiede zwischen BDIV und BDIX Ratten untersucht, die mit den bisher aufgedeckten Effektormechanismen für Resistenz und Suszeptibilität in Zusammenhang stehen könnten und in den assoziierten chromosomalen Regionen *Mss1-7* liegen.

### 4.5.1 Kandidatengene im Locus *Mss2 (Pten)* und Locus *Mss4 (Akt1)*

Als Kandidatengene wurden das als Proto-Onkogen geltende *Akt1* Gen und sein Interaktionspartner, das Tumorsuppressorgen *Pten* ausgewählt. *Pten* liegt im Locus *Mss2* und sein direkter Interaktionspartner *Akt1* liegt in dem Segment auf Chromosom 6, das dem Locus *Mss4* entspricht.

#### 4.5.1.1 Sequenzierung des *Akt1* und *Pten* Gens auf genomischer Ebene

Die Basensequenz aller Exons mit ca. 100 bp flankierenden Intronabschnitten des *Akt1* und des *Pten* Gens wurden auf genomischer Basis sowohl im BDIV als auch im BDIX Stamm bestimmt. Es wurde ein Polymorphismus (BDIV: G, BDIX:T) im Intron 4 des *Akt1* Gens, 50 bp vor Beginn des Exons 5 zwischen BDIV und BDIX Ratten entdeckt (siehe Anhang 4). Bei der Sequenzanalyse des *Pten* Gens zeigten alle 8 Exons und flankierende Intronabschnitte exakt die identische Basensequenz zwischen BDIV und BDIX Ratten.

#### 4.5.1.2 Expressionsanalyse des *Akt1* und *Pten* Gens auf RNA- und Proteinebene

Weitere Untersuchungen konzentrierten sich auf die Expression beider Gene in den *Nervi trigemini* beider Rattenstämme. Nachdem die immunhistochemische Analyse an Paraffinschnitten der *Nervi trigemini* von BDIV und BDIX Ratten nicht zu eindeutig interpretierbaren Ergebnissen geführt hatte, wurde zunächst die Genexpression auf RNA-Ebene in beiden Inzuchtstämmen mittels Real-Time-PCR verglichen.

Die Expression der Kandidatengene *Akt1* und *Pten* wurde in beiden Rattenstämmen zu verschiedenen Entwicklungszeitpunkten (Postnataltag 13, 36, 62 und 104) in EtNU-exponierten Ratten und unbehandelten Kontrolltieren gemessen.



Für die Expressionsanalyse auf RNA-Ebene wurde die zum jeweiligen Zeitpunkt (Postnataltag 13, 36, 62 bzw. 104) in beiden Inzuchtstämmen vorhandene Gesamt-RNA aus den *Nervi trigemini* von EtNU-exponierten Tiere und Kontrolltieren isoliert und mit Random-Hexamerprimern in cDNA umgeschrieben. Die cDNA-Synthese wurde überprüft, indem die gewonnene cDNA in einer konventionellen PCR mit *Akt1* spezifischen Primern als Template eingesetzt wurde (Abbildung 4.19). In allen untersuchten Proben konnte das *Akt1* Genfragment auf cDNA-Ebene amplifiziert werden.

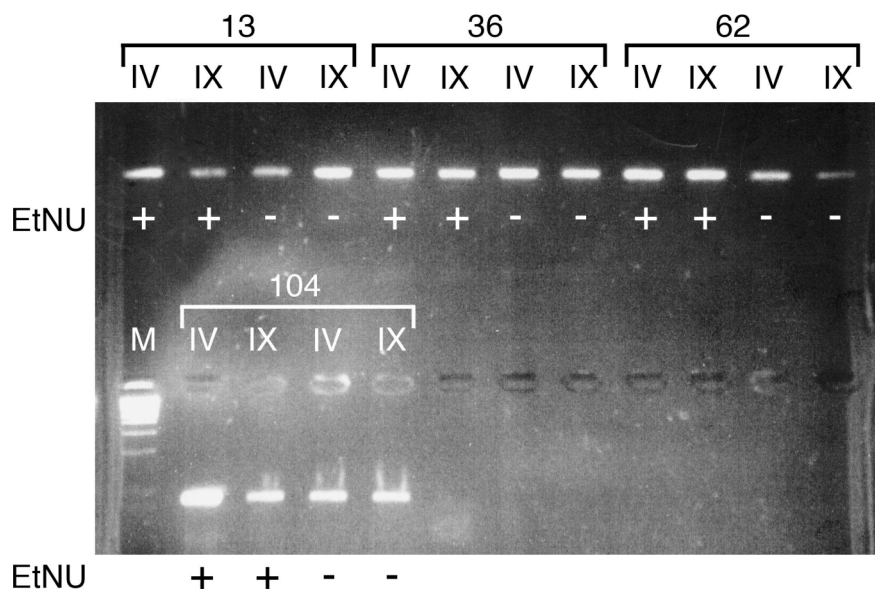


Abbildung 4.19: Agarosegel (mit Ethidiumbromid gefärbt) der Produkte der *Akt1* Amplifikation in der Plateau-Phase einer konventionellen PCR. Die Laufgeschwindigkeit des amplifizierten DNA-Fragments entspricht der zu erwartenden Länge von 89 bp.

Die cDNA diente als Template für die eigentliche Real-Time-PCR, bei der *Akt1*, *Pten* und *GAPDH* (*Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase*) mit sequenzspezifischen Primern amplifiziert wurden. Die relative Quantifizierung der Menge an RNA des *Akt1* und *Pten* Gens, die zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme im *Nervus trigeminus* vorlag, erfolgte über Abgleich mit dem „Housekeeping gene“ *GAPDH*.



Tabelle 4.3: Delta-Ct-Werte der Real-Time-PCR zur Expressionsanalyse des *Akt1* und *Pten* Gens in den *Nervi trigemini* von EtNU-exponierten und unbehandelten BDIV und BDIX Ratten.

Stamm	Postnatal-tag	EtNU	<i>Akt1-GAPDH</i> Delta-Ct-Wert	<i>Pten-GAPDH</i> Delta-Ct-Wert
BDIV	13	EtNU	2,8	2,7
BDIX	13	EtNU	2,705	2,9
BDIV	13	Kontrolle	4,005	3,22
BDIX	13	Kontrolle	2,995	3,205
BDIV	36	EtNU	3,31	3,625
BDIX	36	EtNU	2,795	2,55
BDIV	36	Kontrolle	3,265	3,245
BDIX	36	Kontrolle	n.a.	n.a.
BDIV	62	EtNU	3,925	3,285
BDIX	62	EtNU	4,34	3,63
BDIV	62	Kontrolle	4,845	3,205
BDIX	62	Kontrolle	3,54	3,405
BDIV	104	EtNU	5,02	3,73
BDIX	104	EtNU	4,79	3,11
BDIV	104	Kontrolle	5,075	n.a.
BDIX	104	Kontrolle	4,41	3,345

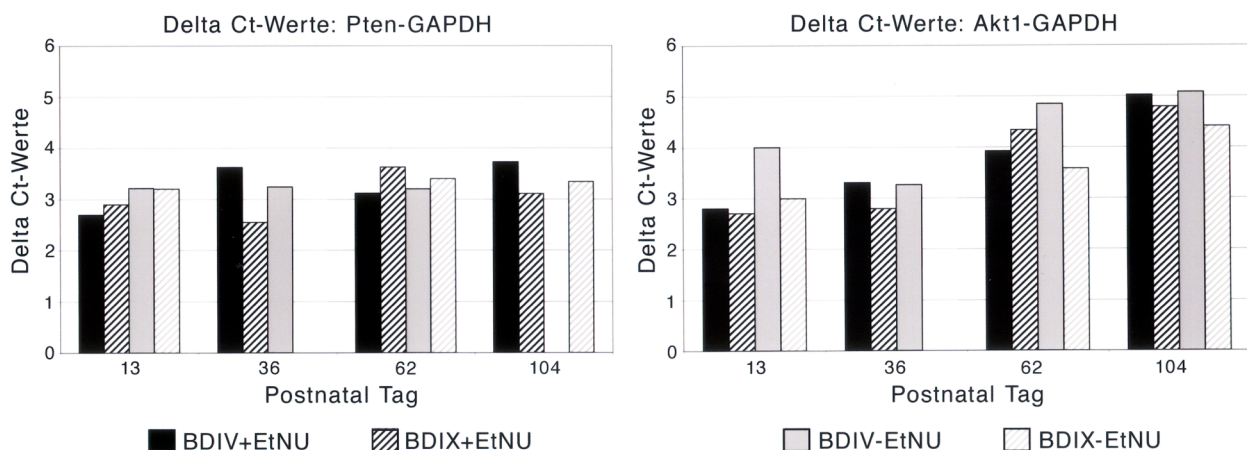


Abbildung 4.20 : Expression des *Akt1* und *Pten* Gens auf RNA-Ebene. Die Daten aus der Tabelle 4.3 sind in dem Säulendiagramm dargestellt.

Das Säulendiagramm (Abbildung 4.20) zeigt, dass die Expression des *Pten* Gens mit Delta-Ct-Werten von 3,205 bis 3,405 bei unbehandelten Ratten beider Inzuchtstämme zu allen Zeitpunkten weniger schwankt, als die Expression des *Pten* Gens bei behandelten Tieren, deren Delta-Ct-Werte zwischen 2,55 und 3,73 liegen.

Die Expression des *Akt1* Gens steigt über die Entwicklung an. Beispielsweise nimmt für BDIV Ratten, die mit EtNU behandelt wurden, die Expression gemessen am Delta-Ct-Wert von 2,8 am Postnataltag 13, auf 3,31 am Postnataltag 36 und 3,925 am Tag 62 bis zu einem

Delta-Ct-Wert von 5,01 am Postnataltag 104 zu. Dieser Expressionsanstieg ist jedoch weder stammspezifisch noch durch die EtNU-Behandlung beeinflussbar. Ähnliches gilt für die Expression des *Pten* Gens. Weder der Rattenstamm, noch der Entwicklungszeitpunkt, noch die Behandlung mit EtNU üben einen Einfluss auf die Genexpression von *Akt1* und *Pten* aus.

Parallel wurden die entsprechenden Proteinlysate elektrophoretisch aufgetrennt und die relative Menge des Genprodukts durch Westernblotting semiquantitativ mit Hilfe des „House-keeping genes“ beta Aktin bestimmt (Abbildung 4.21).

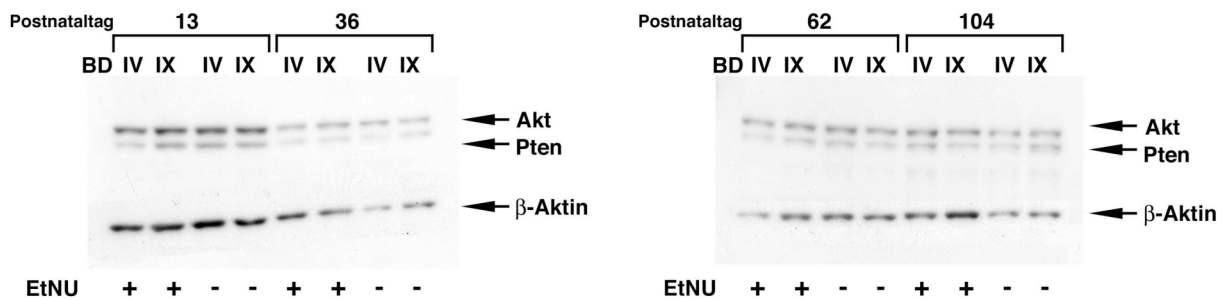


Abbildung 4.21: Westernblotanalyse der *Akt1* und *Pten* Genexpression in den Nervi trigemini von BDIV und BDIX Tieren.

Die stärkere Intensität der Banden für Akt1 und Pten am Postnataltag 13 beruht darauf, dass hier mehr Protein eingesetzt wurde. Denn auch die den Antikörper bindenden Banden für beta Aktin am Postnataltag 13 sind deutlich stärker als an den übrigen Entwicklungszeitpunkten. Auf Proteinebene zeigte sich demnach zu keinem hier analysierten Zeitpunkt ein das zweifache übersteigender Expressionsunterschied zwischen den Rattenstämmen mit und ohne EtNU-Behandlung.

#### 4.5.2 Kandidatengene im Locus *Mss7*

Bei Weibchen vermitteln homozygote BDIV Allele im Locus *Mss7* Resistenz gegenüber der EtNU-induzierten Kanzerogenese im PNS. Im Gegensatz dazu ändert sich das Risiko der männlichen Tiere mit diesem Genotyp für den Locus *Mss7* nicht. Dies lässt auf eine geschlechtsspezifische Wirkung der/des beteiligten Gene/s im *Mss7* Locus schließen.

Im Locus *Mss7*, der nach Haplotypenanalyse auf 12,21 Mb vom Marker *D10Rat51* bis *D10Rat43* eingengt werden konnte, liegen nach Angaben der Gendatenbank “NCBI Map Viewer” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map>) ca. 220 Gene. Nur das Gen *Adcy9*, das für die Adenylatcyclase kodiert, kommt nach bisherigen Erkenntnissen nach funktionellen Kriterien und auf der Basis des geschlechtsspezifischen Aspekts als offensichtliches Kandidatengen in Frage.

### 4.5.3 Kandidatengene im Locus *Mss4*

#### 4.5.3.1 Identifizierung von Kandidatengenen, die Tumorsuszeptibilität bzw. –resistenz vermitteln nach funktionellen Kriterien

Bei einem systematischen Screening der Gene, die sich in dem (auf 20,25 Mb vom Marker *D6Rat218* bis *D6Ngb* eingegrenzten) Locus *Mss4* befinden, mit Hilfe der elektronischen Gendatenbank “NCBI Map Viewer” (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/map>) im Hinblick auf ihre Funktion fielen eine Reihe interessanter Kandidatengene auf, die in Zusammenhang mit den bisher entdeckten Effektormechanismen stehen könnten (Abbildung 4.22). Sie könnten also u.a. bei der Reifung und Aktivierung von T Lymphozyten, bei „Immunoescape“-Mechanismen präaligner Schwann Zellen oder bei deren Apoptoseprozess eine Rolle spielen.

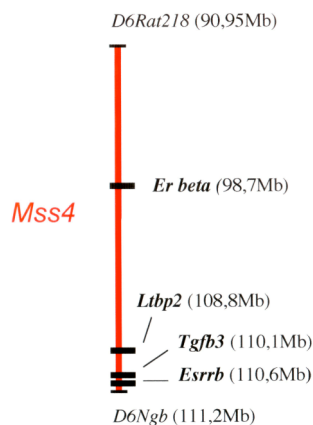


Abbildung 4.22: Physikalische Lage der Kandidatengene: *Er beta*, *Ltbp 2*, *Tgf beta 3* und *Esrrb* im Locus *Mss4* (*D6Rat218*- *D6Ngb*).

##### 4.5.3.1.1 „Transforming growth factor beta 3“ (*Tgf beta 3*) Gen und „Latent Tgf beta binding protein 2“ (*Ltbp 2*) Gen

Von der funktionellen Seite kam in erster Linie das *Tgf beta 3* Gen in Frage. Es konnte schon vor längerer Zeit gezeigt werden, dass die Sekretion der *Tgf beta 1*, *Tgf beta 2* und *Tgf beta 3* Proteine Schwannomzellen vor ihrer Eliminierung durch zytotoxische T Lymphozyten schützen können (Altenschmidt, Kahl et al. 1997). Ltbps sind an dem Zusammenbau, bei der Sekretion und bei dem zielgerichteten Transport des Tgf beta Proteins beteiligt. Daher scheinen diese Proteine eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle und Steuerung der Aktivität des Tgf beta Proteins zu spielen (Oklu and Hesketh 2000).

#### 4.5.3.1.2 Sequenzierung des *Tgf beta 3* Gens

Das *Tgf beta 3* Gen der Ratte besteht aus 7 Exons. Sowohl die Promotorregion als auch die kodierenden Regionen dieses Gens wurde bei beiden Rattenstämmen auf cDNA-Basis sequenziert (Abbildung 4.23). Es wurde lediglich ein Nukleotidpolymorphismus (BDIV: A, BDIX: G) in einer 60 bp langen GA-Sequenz außerhalb des Kernpromotors gefunden, der keine offensichtlichen funktionellen Konsequenzen hat (siehe Anhang 5).

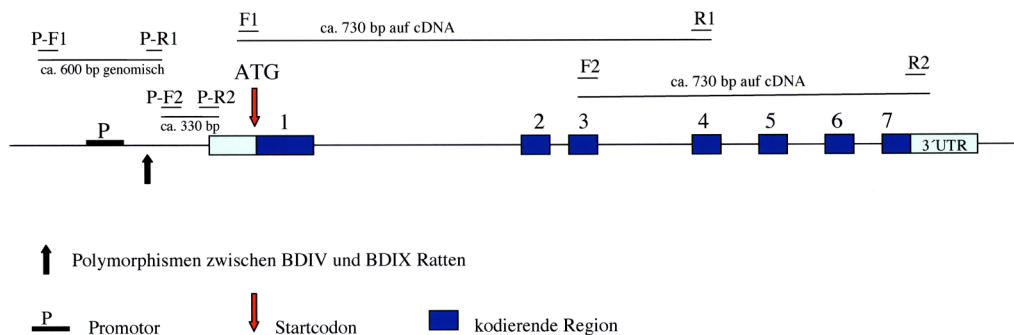


Abbildung 4.23: Genomische Struktur des *Tgf beta 3* Gens und Lage der Primer, die für die Sequenzierung verwendet wurden. Die komplementäre Sequenz für den Primer F1 befindet sich vor dem ersten Exon. Das Produkt, das zwischen den Primern F1 und R1 synthetisiert wird, umfasst die Exons 1, 2, 3 und einige Basen des Exons 4. Das Primerpaar F2 und R2 umfasst einige Basen des Exons 3, die Exons 4, 5, 6 und 7. Beide PCR-Produkte umfassen auf cDNA-Ebene ca. 730 bp. Für die Sequenzierung des Promotorbereichs wurden die Primerpaar P-F1 mit P-R1 und P-F2 mit P-R2 verwendet.

#### 4.5.3.1.3 Sequenzierung des *Ltbp 2* Gens

Das *Ltbp 2* Gen enthält über 30 Exons und die Sequenz ist GC-reich. Dies erschwert die komplette Sequenzierung dieses Gens. Die Sequenzierung beschränkte sich daher auf die C-terminalen 4 Exons auf cDNA-Ebene. Die Basenabfolge der Stämme BDIV und BDIX war für das sequenzierte 725 bp umfassende cDNA-Fragment identisch.

#### 4.5.3.2 Identifizierung von Kandidatengenem auf der Basis des geschlechtsspezifischen Effekts des Locus *Mss4*

##### 4.5.3.2.1 “*Estrogen receptor beta*” (*Er beta*) Gen und “*Estrogen related receptor beta*” (*Esrrb*) Gen

Die bei weiblichen Tieren gefundene Assoziation des *Mss4* Locus mit der Resistenz gegenüber dem Auftreten von MPNSTs lässt auf eine geschlechtsspezifische Wirkung der beteiligten Gene schließen.

Für den geschlechtsspezifischen Effekt bei der PNS-Kanzerogenese scheint Östrogen eine wesentliche Rolle zu spielen (Aoyama, Naito et al. 1989) Gene, die durch dieses Steroid in ihrer Expression/ Aktivität beeinflusst werden, bzw. Gene, die eine östrogenabhängige Regulation vermitteln, kommen daher als Kandidatengene in Frage. In diesem Zusammenhang schien die Sequenzierung der Gene für den “*Estrogen receptor beta*” (*Er beta*) und den „*Estrogen related receptor beta*“ (*Esrrb*) im *Mss4* äußerst interessant.

##### 4.5.3.2.2 Sequenzierung des „*Estrogen related receptor beta*“ (*Esrrb*) Gens

Es wurde sowohl die Basensequenz aller 8 Exons des *Esrrb* für die Stämme BDIV und BDIX auf cDNA-Ebene als auch die der Promotorregion auf genomischer Ebene bestimmt. Weder in der kodierenden Region noch im Promotor beider Rattenstämme konnten Sequenzunterschiede festgestellt werden.

##### 4.5.3.2.3 Sequenzierung des „*Estrogen receptor beta*“ (*Er beta*) Gens

Die genomische Struktur des *Er beta* Gens ist in Abbildung 4.24 dargestellt. Die Sequenz aller 8 Exons wurde auf cDNA-Ebene für beide Rattenstämme bestimmt. Die Sequenz der BDIV Ratte ist in Anhang 6 vollständig dargestellt. Im Vergleich zur Basenabfolge im Genom der BDIX Ratte zeigen sich auf cDNA-Ebene folgende Basenaustausche:

Position	Sequenz BDIV	Sequenz BDIX
vor Exon 1	- tcc-tac-gta-	-tcc-tat-gta-
Exon 1	-tat-gca-gaa-	-tat-gcg-gaa-
Exon 4	-gaa-gct-gaa-	-gaa-gcc-gaa-

Der Austausch von Cytidin (BDIV) zu Thymidin (BDIX) vor dem Exon 1 hat auf die Aminosäuresequenz des Er beta Proteins keine Einfluss. Die Sequenz wird in mRNA umgeschrieben, aber nicht translatiert, da sie vor dem im peripheren Nervensystem verwendeten Start-Codon liegt (siehe Anhang 6 ). Bei dem Austausch von Adenosin (BDIV) zu Guanodin (BDIX) im Exon 1 und Thymidin (BDIV) zu Cytidin (BDIX) im Exon 4 handelt es sich um stille Basenaustausche, die nicht zu einer veränderten Aminosäuresequenz führen. In beiden Fällen kodieren die Basentriplets für Alanin.

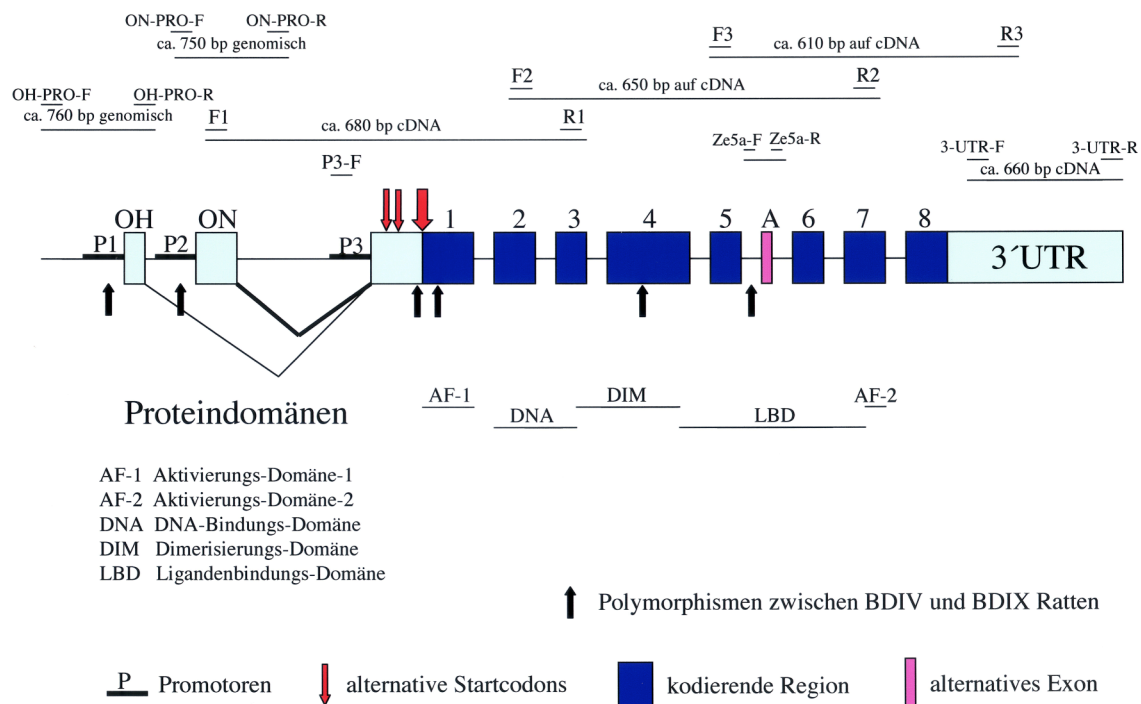


Abbildung 4.24: Genomische Struktur des „*Estrogen receptor beta*“ Gens und Lage der Primer, die für die Sequenzierung verwendet wurden. Die komplementäre Sequenz für den Primer F1 befindet sich im 5'untranslatierten Bereich (5'UTR) des ON-Promotors. Das Produkt, das zwischen den Primern F1 und dem R1 synthetisiert wird umfasst die Exons 1, 2 und 3. Das Primerpaar F2 und R2 umfasst einige Basen des Exons 2, die Exons 3, 4, 5, A (alternatives Exon 5), 6 und 7. Der Primer F3 lagert sich im Exon 5 an. Die PCR-Produkte die er mit dem reversen Primer R3 bildet, umfassen einige Basen von Exons 5, das alternative Exon 5 und die Exons 6, 7 und 8. Die Nukleotidpolymorphismen, die auf genomischer bzw. cDNA-Ebene zwischen BDIV und BDIX Ratten im „*Estrogen receptor beta*“ Gen gefunden wurden, sind durch schwarze Pfeile dargestellt.

Die RT-PCR Produkte aus den Ansätzen mit den Primerkombinationen F2 mit R2 und F3 mit R3 enthielten sowohl Transkripte, die das alternative Exon 5 umfassten, als auch solche ohne das Zusatzexon 5. Dies erschwerte die Bestimmung der Sequenz des Zusatzexon 5 auf cDNA-Ebene. Daher wurde die Basensequenz des alternativen Exon 5 auf genomischer Ebene mit dem Primerpaar Ze5a-F und Ze5a-R bestimmt. Die Bestimmung der Basensequenz des 3'-untranslatierten Bereichs (3'UTR) und der drei Promotoren des *Er beta* Gens erfolgte auf genomischer Ebene. Für die Sequenzierung des Promotors P3 wurde der „forward“-Primer P3-F und mit dem reversen Primer R1 kombiniert. Die genaue Lage der Primer und die exakte Position der Basenaustausche zwischen BDIV und BDIX sind aus Anhang 7 und 8 ersichtlich. Es wurden folgende Basenunterschiede entdeckt:

Position	Sequenz BDIV	Sequenz BDIX
Intron vor Zusatzexon 5	-tggttcagaaact-	-tggttcggaact-
OH-Promotor	-ctagg <sup>t</sup> gccttg-	-ctagg <sup>c</sup> gccttg-
ON-Promotor	-tcacgtgaactt-	-tcacgtggactt-

Die Analyse des ON-Promotors mit Hilfe der Datenbank „TFSEARCH“ (Version 1.3) (<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH>) ergab, dass sich unmittelbar vor der Position, die sich zwischen BDIV und BDIX Ratten unterscheidet, die Sequenz -cacgtg- befindet, die der Sequenz einer E-Box (CANNTG) entspricht. Dieses Promotormotiv dient als Erkennungssequenz für Transkriptionsfaktoren wie Sharp 2 (Rat enhancer of split- and hairy-related protein 2), Usf (Upstream stimulatory factor), Arnt (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) und Srebp (Sterol regulatory element binding protein) (Abbildung 4.25). Es gibt bereits experimentelle Untersuchungen zur Bedeutung der flankierenden Nukleotide für Stra 13, das das Homolog der Maus zu Sharp 2 der Ratte ist, und Arnt. Diese zeigen, dass die Bindungsaffinität dieser Transkriptionsfaktoren erhöht wird, wenn das E-Box-Motiv am 3'-Ende von einem Adenosin gefolgt wird. Mit Hilfe der Datenbank „MAPPER“ (Model M00796) (<http://bio.chip.org/mapper>) können die Auswirkungen eines Basenaustausches auf das Bindungsverhalten von Transkriptionsfaktoren ermittelt werden. Der Basenaustausch beeinflusst demnach auch die Bindung des Transkriptionsfaktors Usf. Der Austausch von Adenosin (BDIV) zu Guanodin (BDIX), der im ON-Promotor gefunden wurde, könnte daher zu einer veränderten Bindung von Transkriptionsfaktoren führen.



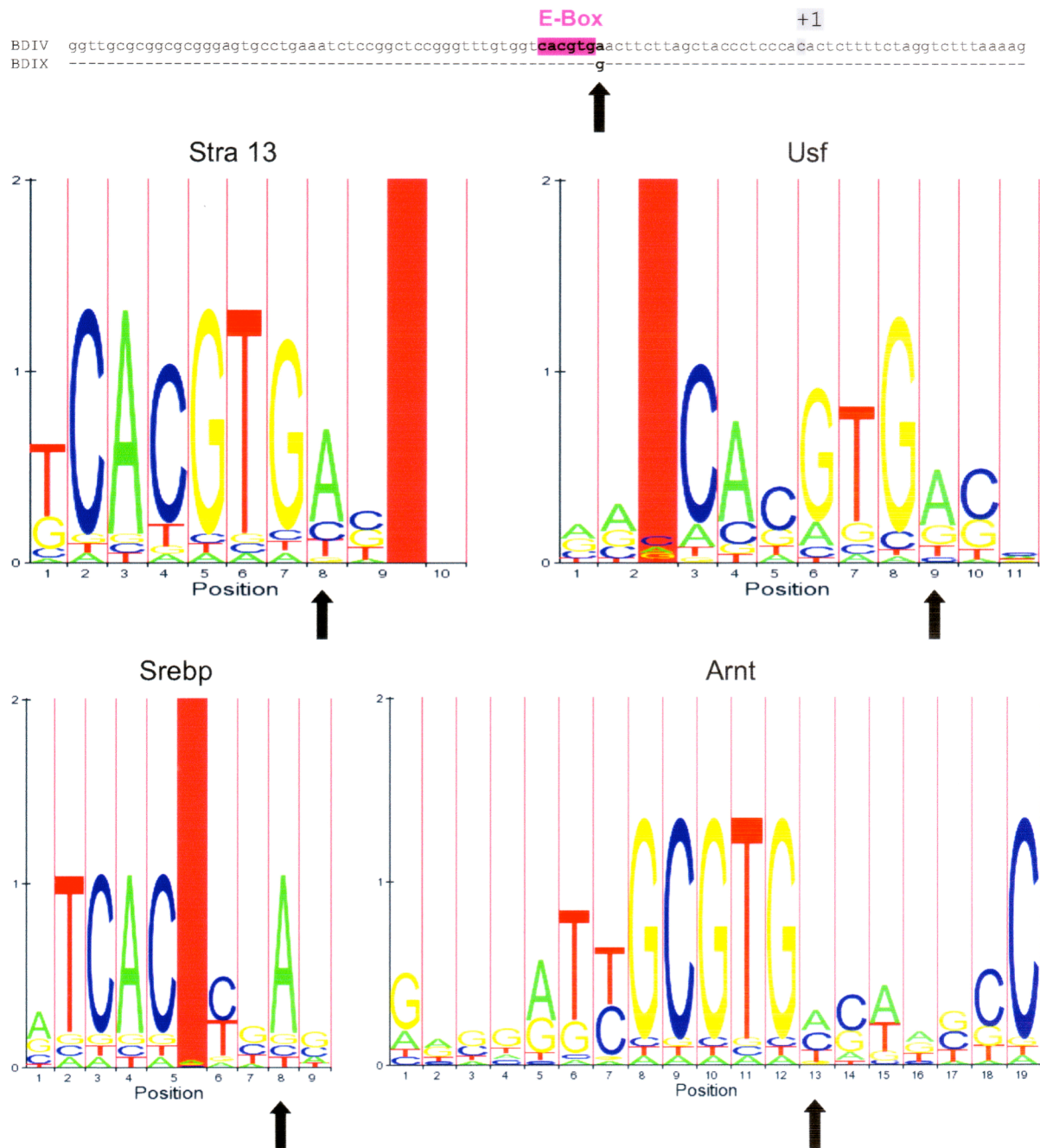


Abbildung 4.25: Nukleotidpolymorphismus zwischen dem Ratteninzuchtstamm BDIV und BDIX im ON-Promotor des „*Estrogen receptor beta*“ Gens und Bindungssequenzen von Transkriptionsfaktoren. Oben: Ausschnitt aus der DNA-Sequenz des ON-Promotors mit dem E-Box-Motiv. Der Transkriptionsstart ist mit +1 bezeichnet. Die Position, die bei BDIV Ratten ein Adenosin und bei BDIX Ratten ein Guanosen aufweist, ist mit einem schwarzen Pfeil gekennzeichnet. Darunter: Bindungssequenzen der Transkriptionsfaktoren Sharp 2 (Stra 13), Usf, Srebp und Arnt an verschiedenen E-Box bzw. E-Box-flankierenden Nukleotiden. Je größer der Buchstabe desto besser die Bindung. Rot hinterlegte Säulen geben mögliche Insertionsstellen an. Darstellung nach Schuster-Bockler, Schultz et al. 2004.



#### 4.5.3.2.4 Promotoraktivität des „Estrogen receptor beta“ (*Er beta*) Gens im Nervus trigeminus der BD Ratte

Wenn der Basenunterschied im ON-Promotor des *Er beta* Gens zwischen den Ratteninzuchtstämmen BDIV und BDIX bei den Suszeptibilität/ Resistenz vermittelnden Mechanismen beteiligt ist, sollte der ON-Promotor in den betreffenden Zellen aktiv sein. Nach unserem bisherigem Kenntnisstand müsste er entweder in den Zellen des Immunsystems, die in den *Nervus trigeminus* nach Kanzerogen-Exposition einwandern, oder in den proliferierenden Schwann Zellen des *Nervus trigeminus* aktiv sein.

Zur Analyse der Promotoraktivität des *Er beta* Gens wurde eine kompetitive RT-PCR durchgeführt. Dazu wurde die RNA des *Nervus trigeminus* einer 100 Tage alten BDIX Ratte und eines MPNSTs (T180) in einer „OneStep RT-PCR“ mit drei verschiedenen „forward“-Primern (OH-RT-F, F1 und P3-F) und dem reversen Primer R1 amplifiziert. Je nachdem welche(r) Promotor(en) in dem Gewebe aktiv ist/ sind, könnten drei verschiedene Transkripte amplifiziert werden (Abbildung 4.26). Es könnte ein 722 bp umfassendes Produkt (Primerkombination OH-RT-F mit R1), ein 655 bp umfassendes Produkt (F1 mit R1) und/ oder ein 755 bp umfassendes Produkt (P3-F mit R1) nachgewiesen werden.

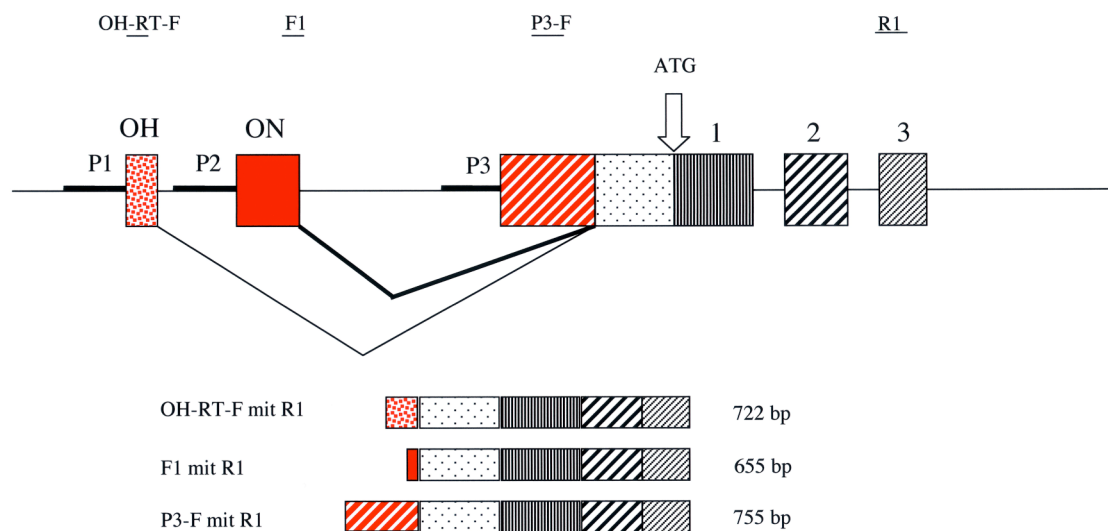


Abbildung 4.26: Schematische Darstellung der Promotorregion des „Estrogen receptor beta“ Gens und den möglichen mRNA-Transkripten bei verschiedenen Promotoraktivitäten. Ein-gezeichnet ist die Lage der Primer, die für die kompetitive RT-PCR verwendet wurden.

In der Agarose-Gelelektrophorese der Amplifikate der reversen Transkription mit anschließender kompetitiver PCR und auch in drei isolierten Ansätzen, in denen jedes Primerpaar einzeln eingesetzt wurde, konnte nur eine Produktbande, die einer Länge von 655 bp entspricht, nachgewiesen werden (Abbildung 4.27).

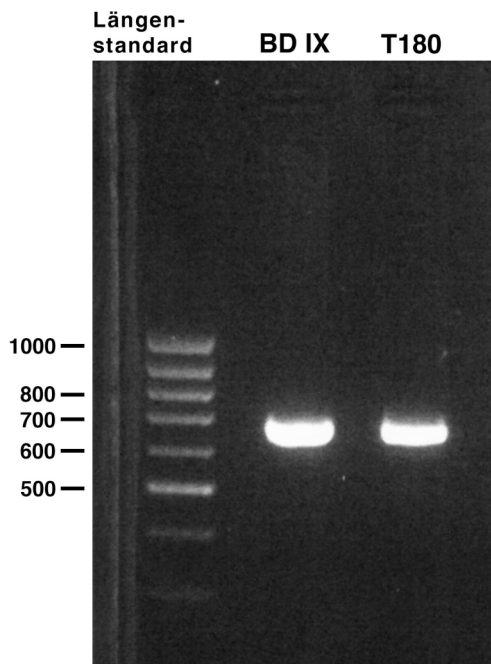


Abbildung 4.27: Agarosegel (mit Ethidiumbromid gefärbt) der kompetitiven RT-PCR zur Bestimmung der Promotoraktivität des *Er beta* Gens im *Nervus trigeminus* der BD Ratte.

#### 4.5.3.2.5 Expressionsanalyse des *Er beta* Gens im *Nervus trigeminus* der BD Ratte auf Proteinebene

Im *Nervus trigeminus* von BD Ratten wurde die Proteinexpression des *Er beta* Gens mittels Westernblotanalyse und Immunhistochemie untersucht.

Bei der Westernblotanalyse konnte im Proteinhomogenat von *Nervi trigemini* je einer adulten weiblichen BDIV und BDIX Ratte mit dem Antikörper SP5198P (Acris) eine antikörperbindende Bande in der Höhe von 55 kDa nachgewiesen werden. Die Menge des *Er beta* Proteins im *Nervus trigeminus* von adulten BDIV und BDIX Weibchen scheint, wenn man die Stärke der *Er beta* Bande mit der Bandenstärke des  $\beta$  Aktins (42 kDa) abgleicht, nahezu gleich (Abbildung 4.28). Ebenso lässt sich *Er beta* Protein im *Nervus trigeminus* adulter männlicher BDIV und BDIX Ratten nachweisen.

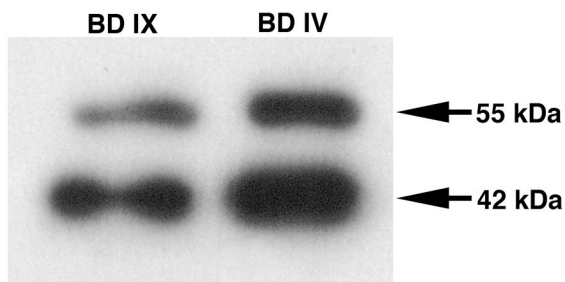


Abbildung 4.28: Westernblotanalyse zum Nachweis des Er beta Proteins.

Die zelluläre Lokalisation des Er beta Proteins im *Nervus trigeminus* von BD Ratten konnte mittels Immunhistochemie ermittelt werden. Hierzu wurden die *Nervi trigemini* adulter, sowohl weiblicher als auch männlicher BDIV und BDIX Ratten unter Verwendung des IgY-Antikörpers ER beta 503 von J.-A. Gustafsson (Karolinska Institut, Stockholm) immunhistochemisch gefärbt. Dieser polyklonale Antikörper stammt aus dem Huhn. Zur Herstellung des ER beta 503-Antikörpers wurden Legehennen mit humanem ER beta Protein, das in seiner Liganden-Bindungs-Domäne durch die Insertion der 18 AS-Sequenz der Ratte modifiziert wurde (beschrieben bei Ogawa, Inoue et al. 1998), immunisiert.

In der Abbildung 4.29 a und b ist die Vergrößerung eines Ausschnitts des *Nervus trigeminus* an der Nerv-Hirn-Grenze zu sehen. Bei dem Gewebeschnitt, der mit dem IgY-Antikörper ER beta 503 inkubiert wurde, sind eine Vielzahl von Zellkernen braun gefärbt (Abbildung 4.29 a). Vereinzelt sind auch nur bläulich und nicht braun gefärbte Zellkerne zu sehen. In der Negativkontrolle ohne ER beta 503-Antikörper ist keine unspezifische braune Färbung zu erkennen (Abbildung 4.29 b). Bei männlichen und weiblichen Ratten beider Stämme konnte Er beta Protein in den Zellkernen nachgewiesen werden.

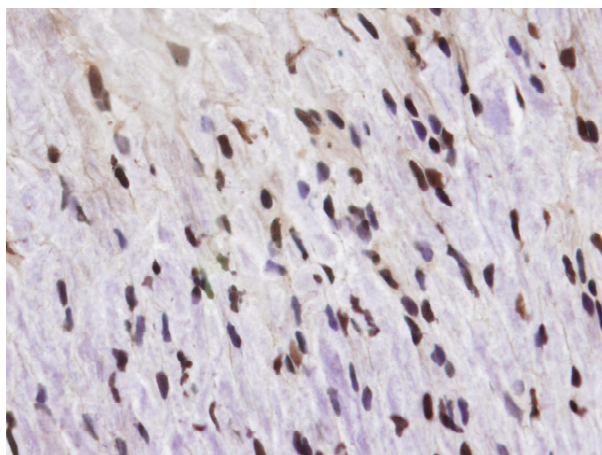


Abbildung 4.29 a: Er beta Protein-Nachweis im Gefrierschnitt des *Nervus trigeminus* einer männlichen, 294 Tage alten BDIV Ratte, die mit EtNU behandelt wurde (40-fache Vergrößerung).

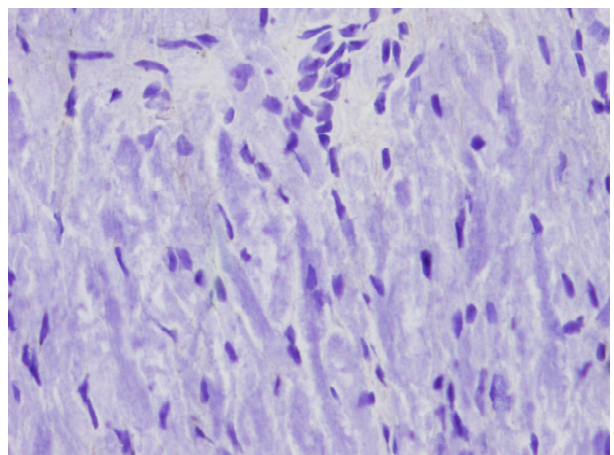


Abbildung 4.29 b: Negativkontrolle, d. h. ohne ER beta 503-Antikörper (40-fache Vergrößerung).

#### 4.5.3.2.6 Expressionsanalyse des *Er beta* Gens in MPNSTs auf Proteinebene

Die Expression des *Er beta* Gens in MPNSTs von *Nervi trigemini* aus BDIX, F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> Ratten wurde untersucht.

Für die Expressionsanalyse des *Er beta* Gens in MPNSTs von BDIX Ratten wurde auf Tumoren von EtNU-behandelten BDIX Ratten aus dem Jahr 1995, die bei -80°C gelagert waren, zurückgegriffen. Der Nachweis des *Sry* Gens („*Sex determining region of Y-Gen*“) auf dem Y-Chromosom der Ratte diente zur Bestimmung des Geschlechts. Die Amplifikation des *Sry* Gens erfolgte über sequenzspezifische Primer wobei genomische DNA der BDIX Tumoren T90A, T120 und T223+ als Template eingesetzt wurde. In einem Kontrollansatz wurden jeweils 5µl DNA bzw. 2 µl DNA (50ng/ µl) einer männlichen und einer weiblichen BD Ratte eingesetzt. Das Geschlecht der Tiere, deren MPNSTs hier analysiert wurden, konnte nachträglich als männlich bestimmt werden (Abbildung 4.30).

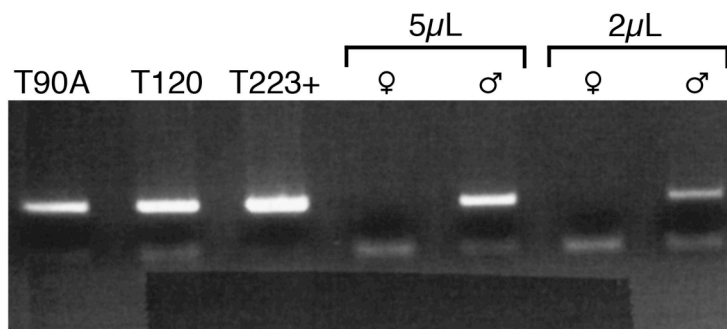


Abbildung 4.30: Gelelektrophorese der Amplifikate des *Sry* Gens.

Die Proteine im Gewebelysat von BDIX, F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> MPNSTs wurden über SDS-Page entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Im Vergleich zum Lysat des *Nervus trigeminus* einer unbehandelten BDIX Ratte, das in der Westernblotanalyse eine starke antikörperbindende Bande aufweist, zeigen die Lysate der BDIX MPNSTs relativ schwache Banden (Abbildung 4.31 a). Vergleicht man Proteinlysate von BDIX, F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> MPNSTs (Abbildung 4.31 b) so zeigt sich, dass die Höhe der *Er beta* Expression in allen MPNSTs unabhängig vom Geschlecht des erkrankten Tieres nahezu identisch ist. Die Positivkontrolle (Proteinlysate des *Nervus trigeminus* eines BDIX Weibchens) in Abbildung 4.31 b weist in Höhe des *Er beta* Proteins eine antikörperbindende Bande auf, die im Vergleich zu anderen Westernblotanalysen unbehandelter weiblicher BDIX Ratten relativ schwach gefärbt ist.

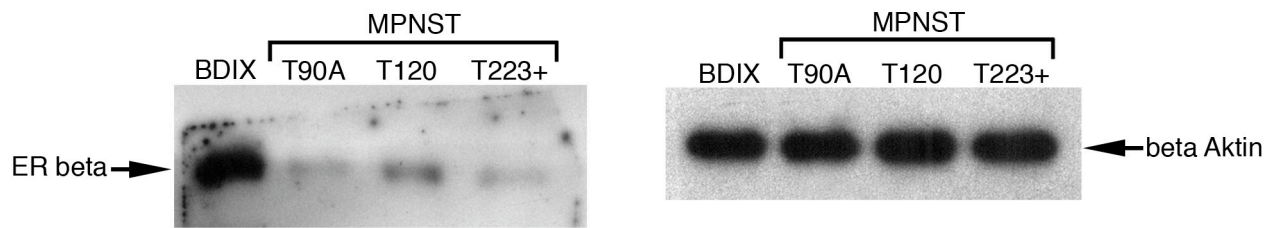


Abbildung 4.31 a: Westernblotanalyse zum Nachweis des Er beta Proteins in den Proteinlysaten von BDIX MPNSTs. Zur relativen Quantifizierung wurde beta Aktin detektiert.

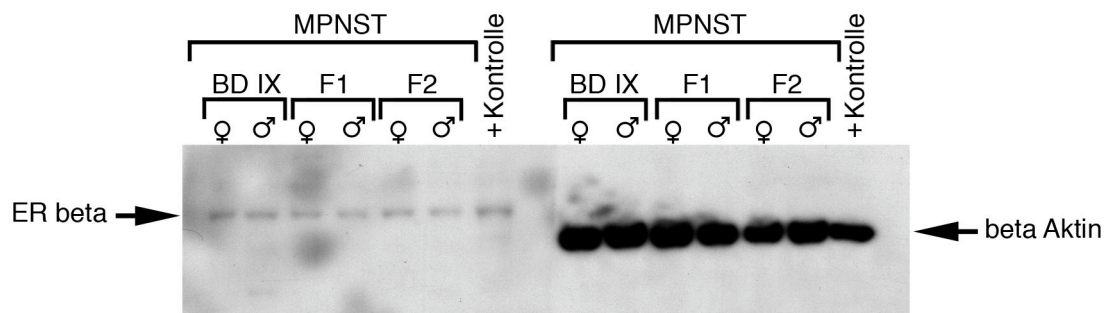


Abbildung 4.31 b: Westernblotanalyse zum Nachweis des Er beta Proteins in den MPNSTs von weiblichen und männlichen BDIX, F<sub>1</sub> und F<sub>2</sub> Ratten.

#### 4.5.3.2.7 Doppeldetektion des Er beta und der Immunzellantigene im Nervus trigeminus der BD Ratte

Über die Möglichkeit, dass die vermutete tumorpräventive Wirkung des Er beta Proteins in BDIV Ratten gegenüber BDIX Ratten nicht durch einen Expressionsunterschied in den prä-malignen Schwann Zellen selbst, sondern in den eingewanderten Zellen des Immunsystems bewirkt wird, können immunhistochemische Experimente Aufschluss geben.

Die Detektion des Er beta Proteins mit dem IgY-Antikörper ER beta 503 kann sowohl auf formalinfixierten Paraffinschnitten als auch auf Gefrierschnitten erfolgen. Bei der Wahl der Fixierung ist die optimale Strukturhaltung des Gewebes gegen die Erhaltung der antigenen Determinanten abzuwägen. Beste Antigenerhaltung zeigen Gefrierschnitte, während die Fixierung mit Formalin sowie die Einbettung des Gewebes in Paraffin die antigenen Determinanten blockieren (reversibler Zustand) oder zerstören (irreversibler Zustand) können. Formalin ist ein vernetzendes Fixativ, verändert Proteine und kann zur Maskierung von Epitopen führen, wodurch die Bindung von Primärantikörpern verhindert werden kann (wie es z. B. bei den hier verwendeten Antikörpern gegen die verschiedenen Immunzellantigene



und gegen das Er beta Protein beobachtet wird). Auf der anderen Seite zeigen solche Paraffinschnitte eine deutlich bessere Morphologie als Gefrierschnitte.

Die Demaskierung der verschiedenen Antigene der Immunzellen würde je nach Antigen verschiedene Behandlungsschritte erfordern, die mit jenen der Er beta Färbung nicht vereinbar sind. Aus diesem Grund wurde die Doppeldetektion des Er beta Proteins und der Immunzellantigene an Gefrierschnitten durchgeführt.

Im unbehandelten PNS der Ratte befindet sich stets eine kleine Population von Makrophagen, die ED1, ED2, CD4 und MHC Antigene exprimieren (Monaco, Gehrmann et al. 1992). Darüber hinaus konnte eine Einwanderung verschiedener Immunzellpopulationen in den *Nervus trigeminus* der BD Ratten als Folge der EtNU-Behandlung beobachtet werden (Gering, Marx et al. 2006).

Die in diesem Dissertationsprojekt durchgeführte Auswertung der mit Antikörpern gegen den Er beta und gegen Oberflächenantigene auf Zellen des Immunsystems gefärbten Gefrierschnitte von 100 Tage alten BDIV und BDIX Ratten beiderlei Geschlechts mit und ohne

EtNU-Behandlung ergab, dass in den *Nervi trigemini* sowohl Er beta positive Immunzellen (d. h. CD4, CD8, ED1 oder ED2 positive Zellen) als auch Er beta positive Schwann Zellen vorkommen. Exemplarisch wird hier die Doppel-Immunfluoreszenzfärbung mit Antikörpern gegen CD4 und Er beta gezeigt (Abbildung 4.32).

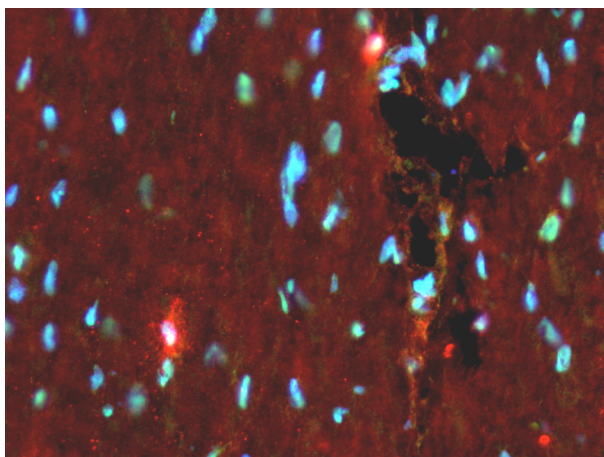


Abbildung 4.32: Nachweis von CD4 (Cy3) und Er beta (DTAF) im *Nervus trigeminus* eines EtNU-behandelten BDIX Weibchens. Deutlich zu sehen sind zwei CD4 positive Zellen, die zudem Er beta Protein exprimieren. Kernfärbung mit DAPI.

Tabelle 4.4 zeigt für einen vorher definierten Gewebeausschnitt der *Nervi trigemini* sämtliche nach den Doppel-Immunfluoreszenzfärbungen ausgezählten Schwann- und Immunzellen.

Experiment Nr.	BDIX ♀	mit EtNU-Behandlung					ohne EtNU-Behandlung				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		CD4	CD8	ED1	ED2	TCR	CD4	CD8	ED1	ED2	TCR
Immunzellenmarker											
Gesamtzahl aller Zellen		140	152	108	111	125	76	75	86	110	57
Anzahl der Schwann Zellen		136	152	108	111	125	73	75	86	106	57
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		69	67	49	41	31	43	44	47	51	27
ohne <i>Er beta</i> Expression		67	85	59	70	94	30	31	39	55	30
Anzahl der Immunzellen		4	0	0	0	0	3	0	0	4	0
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		4	0	0	0	0	1	0	0	2	0
ohne <i>Er beta</i> Expression		0	0	0	0	0	2	0	0	2	0

Experiment Nr.	BDIX ♂	mit EtNU-Behandlung					ohne EtNU-Behandlung				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		CD4	CD8	ED1	ED2	TCR	CD4	CD8	ED1	ED2	TCR
Immunzellenmarker											
Gesamtzahl aller Zellen		69	68	70	57	83	72	82	101	89	71
Anzahl der Schwann Zellen		65	68	70	56	83	67	82	101	86	71
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		31	38	40	27	40	25	43	52	37	39
ohne <i>Er beta</i> Expression		34	30	30	29	43	42	39	49	49	32
Anzahl der Immunzellen		4	0	0	1	0	5	0	0	3	0
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		3	0	0	1	0	5	0	0	3	0
ohne <i>Er beta</i> Expression		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Experiment Nr.	BDIV ♀	mit EtNU-Behandlung					ohne EtNU-Behandlung				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		CD4	CD8	ED1	ED2	TCR	CD4	CD8	ED1	ED2	TCR
Immunzellenmarker											
Gesamtzahl aller Zellen		98	76	116	88	81	100	116	96	91	95
Anzahl der Schwann Zellen		96	75	116	88	81	97	116	95	89	95
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		49	35	50	42	33	47	54	46	50	43
ohne <i>Er beta</i> Expression		47	40	66	46	48	50	62	49	39	52
Anzahl der Immunzellen		2	1	0	0	0	3	0	1	2	0
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		2	1	0	0	0	3	0	1	2	0
ohne <i>Er beta</i> Expression		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Experiment Nr.	BDIV ♂	mit EtNU-Behandlung					ohne EtNU-Behandlung				
		1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
		CD4	CD8	ED1	ED2	TCR	CD4	CD8	ED1	ED2	TCR
Immunzellenmarker											
Gesamtzahl aller Zellen		71	63	76	82	78	75	66	84	79	58
Anzahl der Schwann Zellen		70	63	76	82	78	68	66	84	79	58
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		30	25	39	34	34	37	37	53	40	22
ohne <i>Er beta</i> Expression		40	38	37	48	44	31	29	31	39	36
Anzahl der Immunzellen		1	0	0	0	0	7	0	0	0	0
<i>Er beta</i> exprimierende Zellen		1	0	0	0	0	5	0	0	0	0
ohne <i>Er beta</i> Expression		0	0	0	0	0	2	0	0	0	0

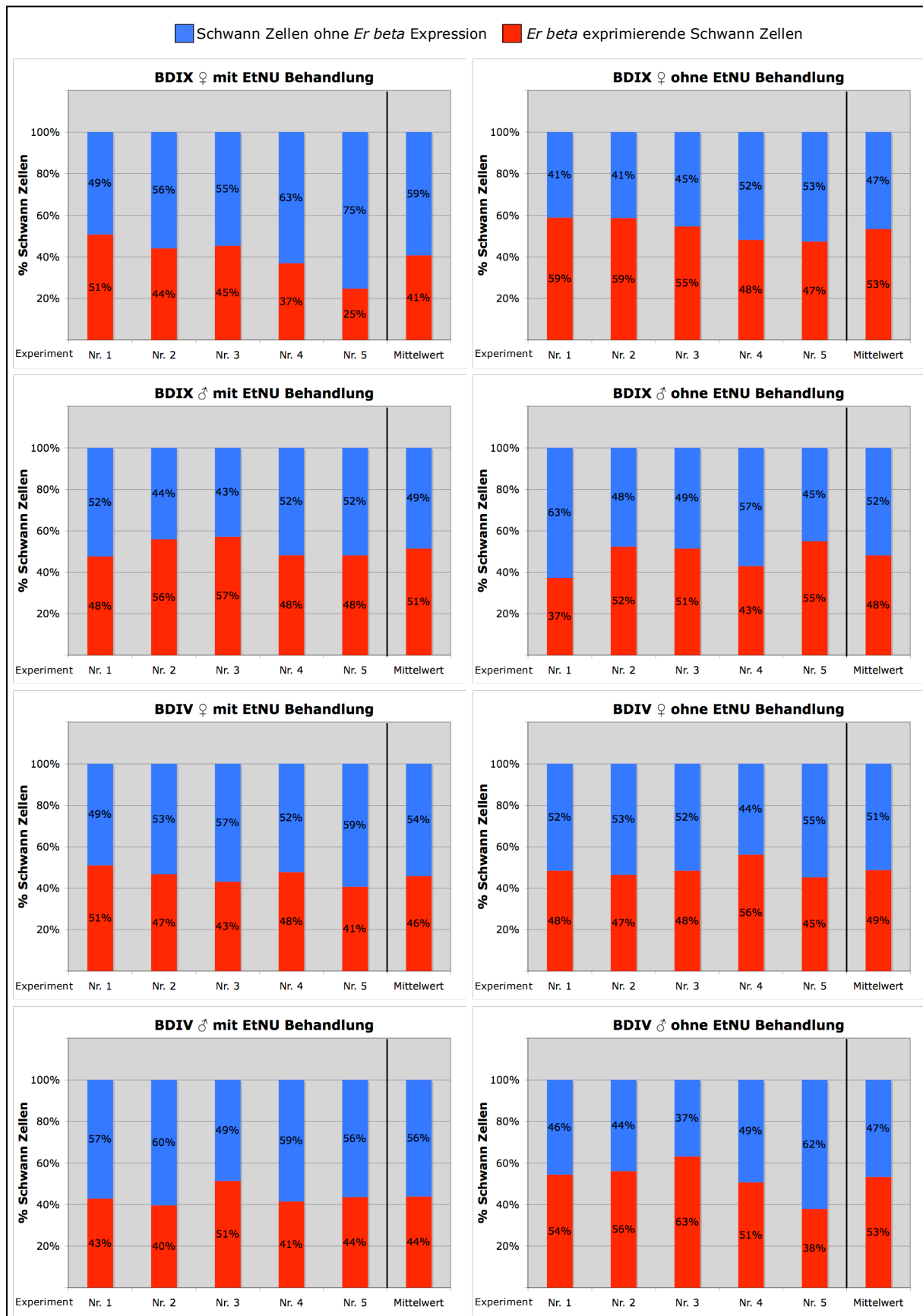


Abbildung 4.33: Verhältnis *Er beta* exprimierender Schwann Zellen zu Schwann Zellen ohne *Er beta* Expression in 100 Tage alten BDIV und BDIX Ratten beiderlei Geschlechts mit und ohne EtNU-Behandlung.



Da in diesem Experiment nur ein kleiner Gewebeausschnitt des *Nervus trigeminus* ausgezählt wurde, die Anzahl der Immunzellen jedenfalls bei unbehandelten Tieren sehr gering ist und insgesamt nur acht Tiere untersucht wurden, ergab die Auszählung nicht genügend Immunzellen, um über deren *Er beta* Expression eine verlässliche Aussage treffen zu können.

In der Abbildung 4.33 sind die Daten aus der Tabelle 4.4 im Säulendiagramm dargestellt. Es wurde der Durchschnittswert aller *Er beta* positiven und negativen Schwann Zellen aus allen Gewebeschnitten eines Tieres ermittelt. Bemerkenswert ist, dass die EtNU-Behandlung in BDIV Weibchen nahezu keinen Einfluss auf das Verhältnis von *Er beta* negativen zu *Er beta* positiven Schwann Zellen hat. Demgegenüber nimmt die Anzahl der *Er beta* exprimierenden Schwann Zellen bei BDIX Weibchen und BDIV Männchen als Folge der EtNU-Behandlung tendenziell ab. Freilich beruhen diese Aussagen auf einer recht kleinen Datenbasis. Sie zeigen aber eine Tendenz auf, die anhand einer entsprechend größeren Anzahl von Tieren zu erhärten sein wird.

## 4.6 Myelinfärbung

Beim immunhistochemischen Nachweis des *Er beta* Proteins in Paraffinschnitten des *Nervus trigeminus* von BD Ratten trat eine immunhistochemische Färbereaktion in den Kernen und in anderen Strukturen außerhalb der Kerne auf (Abbildung 4.34 a).

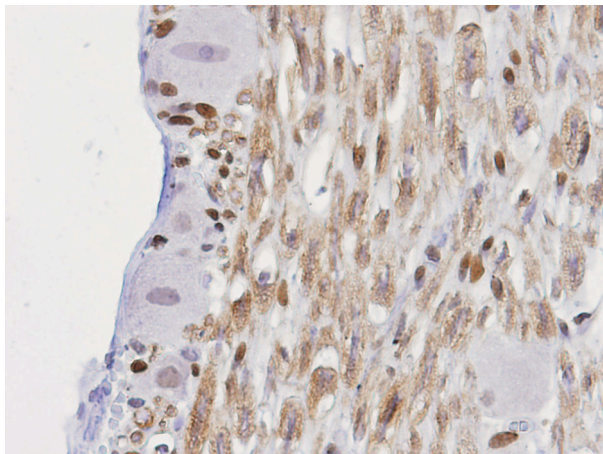


Abbildung 4.34 a: *Er beta* Protein-Nachweis im Paraffinschnitt des *Nervus trigeminus* einer adulten weiblichen BDIV Ratte (40-fache Vergrößerung des Längsschnitts).

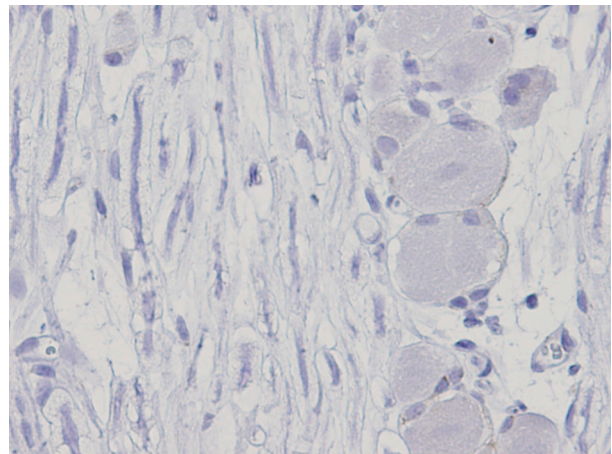


Abbildung 4.34 b: Negativkontrolle. Der Schnitt wurde lediglich mit dem sekundären Antikörper und dem Detektionssystem behandelt (40-fache Vergrößerung des Längsschnitts).

Zu den Abbildungen 4.34 a und b: (a) Immunhistochemische Färbung mit dem IgY-Antikörper ER beta 503 (Karolinska Institut, Stockholm) zum Nachweis des Er beta Proteins im paraffineingebetteten *Nervus trigeminus* einer adulten weiblichen BDIV Ratte. Im linken Bildausschnitt sind große, runde Ganglionzellen zu sehen. Sie sind von Satellitenzellen umgeben, deren Zellkern man deutlich sieht. Eine Vielzahl der Zellkerne der Schwann Zellen ist braun gefärbt. Außerdem sind Strukturen, die außerhalb des Zellkerns liegen, braun gefärbt. (b) In der Negativkontrolle (ohne IgY-Antikörper ER beta 503) findet sich weder eine unspezifische Färbung in den Zellkernen noch in anderen Strukturen außerhalb des Zellkerns.

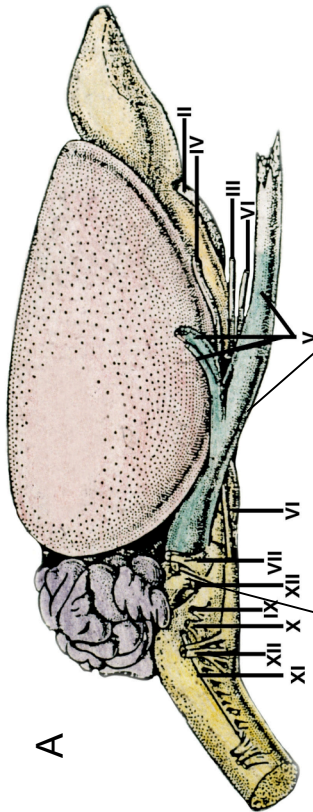
Der *Nervus trigeminus* besteht aus Axonen, aus Myelinscheiden, die die Axone umhüllen, und aus den myelinbildenden Schwann Zellen. Außerdem gehören zum Nerv das ihn umgebende Bindegewebe (Endoneurium und Perineurium) sowie die den Nerv versorgenden Blutgefäße.

Da bekannt ist, dass einige Proteine (unspezifisch) an Myelin binden, lag die Vermutung nahe, dass es sich bei der Braunfärbung außerhalb des Zellkerns um eine unspezifische Anlagerung des IgY-Antikörpers an Myelin handelt.

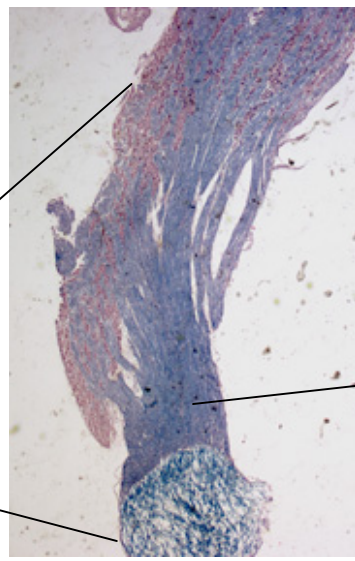
Um die Strukturen außerhalb der Zellkerne, die eine immunhistochemische Färbereaktion zeigten, genauer zu bestimmen, wurde der *Nervus trigeminus* mit Luxol Fast blue gefärbt. Der Farbstoff Luxol Fast Blue zeigt spezifische Affinität für Neurokreatin (Bestandteil des Myelins) und färbt dies bläulich an.

Die Abbildung 4.35 zeigt die Färbung des *Nervus trigeminus* mit Luxol Fast Blue. Die Strukturen, die bei der immunhistochemischen Färbung des *Nervus trigeminus* (Paraffinschnitt) mit dem ER beta 503 Antikörper außerhalb der Kerne angefärbt sind, werden durch den Farbstoff Luxol Fast Blue gefärbt.

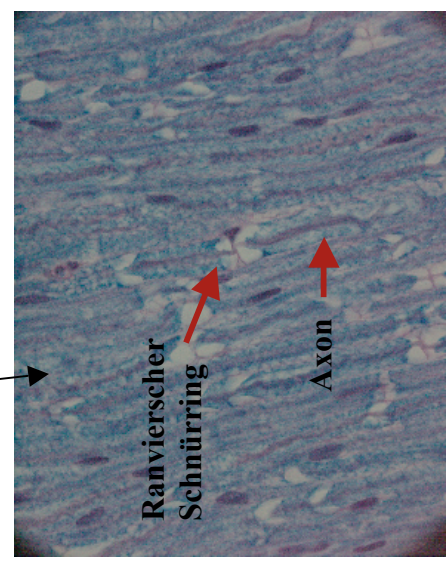
Abbildung 4.35 A-C : Darstellung des Rattengehirns und Markscheidenfärbung des *Nervus trigeminus*.



A Im oberen Bild ist schematisch das Rattengehirn von der Seite gesehen mit den austretenden Hirnnerven dargestellt (siehe Storch und Welsch 1996). Die römische Zahlen (I bis XII) stehen für die zwölf Hirnnerven. Der fünfte Hirnnerv (*Nervus trigeminus*) ist grünlich dargestellt.



B Der Austritt des *Nervus trigeminus* aus dem Gehirn mit dem *Ganglion trigeminale* (auch als *Ganglion Gasseri* bezeichnet) ist in der sich darunter befindenden mikroskopischen Übersichtsaufnahme mit Luxol Fast Blue gefärbt. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin nach Böhmer (Zellkerne) und Eosin (Zytoplasma) (2,5-fache Vergrößerung des Längsschnitts).



C Darstellung der Markscheide mit Luxol Fast Blue im Detail (60-fache Vergrößerung). Gegenfärbung mit Hämatoxylin nach Böhmer und Eosin. Deutlich zu sehen sind das Zytoplasma in den Axonen und die Ranvierschen Schnürringe.